

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 7 月 14 日 (14.07.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/063981 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/09, C07K 16/28,
C12P 21/08, A61K 39/395, A61P 37/00

馬県高崎市宮原町 3 番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探
索研究所内 Gunma (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/019750

(74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
1050001 東京都港区虎ノ門 4 丁目 3 番 20 号 神谷町MT
ビル 19 階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2004 年 12 月 24 日 (24.12.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2003-431408
2003 年 12 月 25 日 (25.12.2003) JP

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 麒麟
麦酒株式会社 (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA)
[JP/JP]; 〒1048288 東京都中央区新川二丁目 1 〇 番
1 号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高橋 信明 (TAKA-
HASHI, Nobuaki) [JP/JP]; 〒3701295 群馬県高崎市宮
原町 3 番地 麒麟麦酒株式会社 医薬探索研究所内
Gunma (JP). 三浦 徹 (MIURA, Toru) [JP/JP]; 〒3701295
群馬県高崎市宮原町 3 番地 麒麟麦酒株式会社 医
薬探索研究所内 Gunma (JP). 北川 義康 (KITAGAWA,
Yoshinori) [JP/JP]; 〒3700013 群馬県高崎市萩原町 100
番地 1 麒麟麦酒株式会社 生産技術研究所内 Gunma
(JP). 平野 亜樹 (HIRANO, Aki) [JP/JP]; 〒3701295 群

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MUTANTS OF ANTI-CD40 ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗 CD40 抗体の変異体

(57) Abstract: It is intended to provide mutants of anti-CD40 antibody, which is expected as therapeutically efficacious, having been optimized as a drug by lowering the ADCC and CDC activities thereof. Namely, an agonistic anti-CD40 monoclonal antibody mutant in which at least the hinge region is a hinge region originating in human IgG2 and which has a mutation and/or a substitution of one or more amino acids causing lowering in the ADCC and/or CDC activities in the constant region; and an antagonistic anti-CD40 antibody mutant which has at least one mutation and/or substitution causing lowering in the ADCC and/or CDC activities in the constant region.

(57) 要約: 治療効果が期待できる抗 CD40 抗体について、医薬品としての最適化の図られた ADCC 活性および CDC 活性が低減された変異体の提供。少なくともヒンジ領域がヒト IgG2 に由来するヒンジ領域であり、定常領域に ADCC および/または CDC 活性の低減をもたらす 1 アミノ酸以上の変異および/または置換を含む、アゴニスティック抗 CD40 モノクローナル抗体の変異体および定常領域に ADCC および/または CDC 活性の低減をもたらす 1 以上の変異もしくは置換を含むアンタゴニスティック抗 CD40 抗体の変異体。



WO 2005/063981 A1

明 細 書

抗CD40抗体の変異体

技術分野

本発明は免疫に関与する細胞膜分子であるCD40を認識する抗CD40抗体に関する。さらに本発明はアゴニスティック、アンタゴニスティック活性を保ちつつ、ADCC活性、CDC活性を低減するために、ヒト抗体定常領域に変異を導入した抗体、もしくはサブクラスの一部の構造を置換した抗体に関する。

背景技術

1. CD40

CD40は分子量50kDaの細胞膜表面に存在する抗原であり、B細胞、樹状細胞(DC)、ある種の癌細胞、そして胸腺上皮細胞に発現している。CD40はB細胞やDCの増殖、分化に重要な働きをしていることが知られている。CD40は、ヒトB細胞表面に発現する抗原として同定され(E. A. Clark et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4494, 1986, I. Stamenkovic et. al., EMBO J. 8:1403, 1989)、アミノ酸配列の相同性から、CD40は、低親和性NGFレセプターやTNFレセプター、CD27、OX40、CD30などが属しているTNFレセプターファミリーの1つのメンバーとして考えられている。ヒトおよびマウスのCD40に対するリガンド(CD40L)は、近年遺伝子クローニングされ、II型膜蛋白質であること、及び活性化したCD4+T細胞に発現していることが分かった。CD40Lは、強力な活性化シグナルをヒトおよびマウスのB細胞に導入することも分かっている。

また、樹状細胞にはB細胞よりも多くのCD40発現が確認されており、重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。CD40がCD40Lと結合すると、抗原提示細胞(APC)の活性化、すなわちCD80(B7-1)やCD86(B7-2)などの補助刺激分子の発現、あるいはIL-12の産生が増強される(Caux, C., et al.: Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. J. Exp. Med., 180:1263, 1994)、(Shu, U., et al.: Activated T cells induce interleukin-

12 production by monocyte via CD40-CD40 ligand interaction .
Eur. J. Immunol., 25:1125, 1995) 。樹状細胞は強い抗原提示能を有し、強力なヘルパーT (Th) 細胞活性化能を持っている。また、ナイーブ (naive) Th細胞のTh1又はTh2細胞への分化を樹状細胞が制御していると考えられている。ミエロイド系樹状細胞である末梢血単球をGM-CSF及びIL-4とともに培養してCD40Lにより成熟させた樹状細胞 (DC1) はin vitroにおいて、IL-12産生能を有し、異系naive Th細胞を刺激活性化し、IFN γ 産生T細胞を誘導する (すなわちTh1への分化を促す) 。この作用は抗IL-12抗体により阻害されることから、IL-12を介した反応と考えられる。一方リンパ組織T領域や、末梢血に存在するplasmacytoid T細胞をIL-3、CD40リガンドとともに培養したリンパ球系樹状細胞 (DC2) は、IL-12産生能は有さず、そして異系naive Th細胞を刺激活性化し、IL-4産生T細胞を誘導し、Th2への分化を促進することが示されている。Th1細胞は細胞性免疫の活性化にかかわり、Th2細胞は液性免疫能を高めると同時に細胞性免疫能の抑制に関与すると考えられている。Th1細胞のヘルプで活性化された細胞傷害性T細胞 (CTL) は、細胞質内で増殖する病原体 (多くのウイルス、リステリア菌、結核菌、およびトキソプラズマ原虫など) や腫瘍細胞を除去することができる。

膜表面に発現したCD40を認識する抗CD40モノクローナル抗体が、B細胞に対していろいろな生物活性を示すことは示されてきた。抗CD40モノクローナル抗体は、CD40とCD40Lとの相互作用に対してアゴニスティックなものと、アンタゴニスティックなものに大別される。

2. アゴニスティック抗体

アゴニスティック抗体の作用として、B細胞の活性化が知られている。たとえば、抗CD40抗体が細胞接着を誘導する (Barrett et al., J. Immunol. 146: 1722, 1991; Gordon et al., J. Immunol. 140: 1425, 1988) 、細胞の大きさを増進する (Gordon et al., J. Immunol. 140: 1425, 1988; Valle et al., Eur. J. Immunol. 19: 1463, 1989) 、抗IgM抗体、抗CD20抗体またはphorbol esterのみで活性化されたB細胞の分裂を誘導する (Clark and Ledbetter, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4494, 1986; Gordon et al., LEUCOCYTE TYPING III. A. J. McMichael ed. Oxford University Press. Oxford, p.426; Paulie et al., J.

Immunol. 142: 590, 1989)、IL4存在下でB細胞の分裂を誘導する(Valle et al., Eur. J. Immunol. 19: 1463, 1989; Gordon et al., Eur. J. Immunol. 17: 1535, 1987)、IL-4刺激、T細胞除去培養細胞のIgE(Jabara et al., J. Exp. Med. 172: 1861, 1990; Gascan et al., J Immunol. 147:8, 1991)、IgG、IgM(Gascan et al., J. Immunol. 147: 8, 1991)の発現を誘導する、IL-4によるB細胞からの可溶性CD23/FcεRIIの分泌と(Gordon and Guy, Immunol. Today 8:339, 1987; Cairns et al., Eur. J. Immunol. 18: 349, 1988)細胞上の発現増強(Challa A, Allergy, 54: 576, 1999)をする、IL-6の生産を促進する(Clark and Shu, J. Immunol. 145: 1400, 1990)ことが報告されている。さらには、CDw32+接着細胞存在下で、IL-4及び抗CD40抗体を添加することにより、ヒト初代培養B細胞から、B細胞クローンを樹立することや(Banchera et al., Science 241:70, 1991)、胚中心の中心細胞のアポトーシスが、抗原レセプターの働きにかかわらず、CD40を介して阻害されること(Liu et al., Nature 342: 929, 1989)が報告されている。以上のようにCD40は、ヒトB細胞表面に発現する抗原として同定されたため、単離された抗体の多くは、主にヒトB細胞に対する増殖分化誘導機能、癌細胞における細胞死誘導活性を指標に評価されてきた(Katira, A. et. al., LEUKOCYTE TYPING V. S. F. Schlossman, et. al. eds. p.547. Oxford University Press. Oxford, W. C. Flansow et. al., LEUKOCYTE TYPING V. S. F. Schlossman, et. al. eds. p.555. Oxford University Press. Oxford, J. D. Pound et. al., International Immunology, 11: 11, 1999,)。

抗CD40抗体がDCを成熟させることが示された(Z. H. Zhou et. al., Hybridoma, 18:471 1999)。さらに、抗原特異的CD8T細胞プライミングにおけるCD4T細胞の役割は、CD40-CD40Lシグナリングを介したDCの活性化にあることが報告され、抗CD40モノクローナル抗体(mAb)により、樹状細胞(DC)の活性化におけるCD4ヘルパーT細胞の役割を代替できることが示された(Shoenberger, S. P., et. al.: T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. Nature, 480, 1998)。また、マウスにおいて抗CD40抗体の投与によりCD40を発現する腫瘍細胞のみならず非発現腫瘍細胞からも生体を防御

可能であることが示された (French, R. R., et. al.: CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help. *Nature Medicine*, 5, 1999)。

上述した機能に基づき、アゴニスティック抗CD40抗体は、細菌、ウイルスなどの感染症の治療、癌の治療等に使用しうるものと考えられている。W002/088186には優れたアゴニスティック活性を有する抗CD40抗体が記載されている。当該アゴニスティック抗体の代表例としてKM341-1-19抗体および2105抗体が挙げられる。KM341-1-19抗体を産生するハイブリドーマKM341-1-19は2001年9月27日、2105抗体を産生するハイブリドーマ2105は2002年4月17日に、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）にブタペスト条約に基づき国際寄託されている。受託番号はFERM BP-7759 (KM341-1-19) およびFERM BP-8024 (2105) である。

3. アンタゴニスティック抗体

一方、上記のように、CD40が免疫反応において重要な役割を担っていることから、CD40とそのリガンドの結合を阻害することで、臓器移植時の免疫抑制や自己免疫疾患の治療薬が開発できると期待される。Sawada-Haseらは、クローン病患者の末梢血中の単球ではCD40を強く発現する細胞の割合が上昇していることを報告している。しかしながら、CD40とそのリガンドの結合を阻害する抗体については、まだ良く分かっていない。そのような阻害性抗体は、たとえば、CD40の機能解析や、CD40の活性化が必要な疾患の治療に有効である可能性がある。また、CD40リガンドに対する阻害抗体も、CD40とCD40リガンドとの結合が関与する疾患薬として有効である可能性が示されている。しかしながら、CD40Lは活性化した血小板に発現するという報告 (V. Henn et. al., *Nature* 391: 591, 1998) があるため、抗CD40L抗体を治療薬として使った場合、血栓を引き起こす危険性が存在することが報告されている (T. Kawai et. al., *Nat. Medi.* 6: 114, 2000)。このような観点から、CD40とそのリガンドの結合を阻害する抗体治療薬としては、抗CD40L抗体よりも、むしろCD40に対する抗体の方が安全性に優れると期待できる。抗CD40抗体としてはCD40LのCD40への結合を抑制し、なおかつ、抗体自身がCD40を活性化しないことが必要とされる。

上述した機能に基づき、アンタゴニスティック抗CD40抗体は、自己免疫疾患の治療、臓器、骨髄等の移植に際しての拒絶反応の抑制に使用しうるものと考えられている。W002/088186には優れたアンタゴニスティック活性を有する抗CD40抗体が記載されている。当該アンタゴニスティック抗体の代表例として4D11抗体が挙げられる。4D11抗体を産生するハイブリドーマ4D11は2001年9月27日に、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）にブタペスト条約に基づき国際寄託されている。受託番号はFERM BP-7758である。

特許文献 1 W002/088186号公報

発明の開示

本件発明は、W002/088186に開示された、治療効果が期待できる抗CD40抗体について、医薬品としての最適化の図られた変異体を作製することを目的とする。

本発明者らは、鋭意研究の結果、従来知られている抗CD40抗体に比して、より疾患への治療効果が高いと考えられる新規なアゴニスティック抗体、及びアンタゴニスティック抗体の変異体を作製することに成功し、本発明を完成した。本件発明における、抗CD40抗体の改変についての基本的な考えかたを下記に詳述する。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2003-431408号の明細書および/または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

図1A-1は、抗CD40アゴニスト抗体のCD40を配列を基に作製したペプチドへの結合部位を示した図である。

図1A-2は、抗CD40アゴニスト抗体のCD40を配列を基に作製したペプチドへの結合部位を示した図である（図1A-1の続き）。

図1B-1は、抗CD40アンタゴニスト抗体のCD40を配列を基に作製したペプチドへの結合部位を示した図である。

図1B-2は、抗CD40アンタゴニスト抗体のCD40を配列を基に作製したペプチドへの結合部位を示した図である（図1B-1の続き）。

図 2 A は、変異CD40に対する抗CD40抗体の結合性を示した図である。

図 2 B は、変異CD40に対する抗CD40抗体の結合性を示した図である。

図 2 C は、変異CD40に対する抗CD40抗体の結合性を示した図である。

図 3 A は、KM341-1-19抗体にP 3 3 1 Sの変異を導入しても、Ramos細胞への結合活性が同程度あることを示した図である。

図 3 B は、KM341-1-19抗体にP 3 3 1 Sの変異を導入しても、Ramos細胞へのCD9 5 発現促進活性が同程度あることを示す図である。

図 4 A は、KM341-1-19抗体にP 3 3 1 Sの変異を導入すると、ウサギ補体を使ったCDC活性が抑制されることを示す図である。

図 4 B は、ヒト補体を使った場合、G2/4が低い補体活性があることを示す図である。

図 5 A - 1 は、2105抗体のサブクラスをIgG 2 から他のサブクラスへ変換した場合、Ramos細胞への結合は変化しないことを示す図である。

図 5 A - 2 は、KM341-1-19抗体のサブクラスをIgG 2 から他のサブクラスへ変換した場合、Ramos細胞への結合は変化しないことを示す図である。

図 5 B - 1 は、2105抗体のサブクラスをIgG 2 から他のサブクラスへ変換した場合、Ramos細胞へのCD9 5 発現促進活性が低下することを示す図である。

図 5 B - 2 は、KM341-1-19抗体のサブクラスをIgG 2 から他のサブクラスへ変換した場合、Ramos細胞へのCD9 5 発現促進活性が低下することを示す図である。

図 6 A - 1 は、KM341-1-19抗体のRamos細胞への結合能は、ヒンジの構造に依存されないことを示す図である。

図 6 A - 2 は、2105抗体のRamos細胞への結合能は、ヒンジの構造に依存されないことを示す図である。

図 6 B - 1 は、KM341-1-19抗体のRamos細胞へのCD9 5 発現促進活性は、アッパーヒンジ、ミドルヒンジが重要であることを示す図である。

図 6 B - 2 は、2105抗体のRamos細胞へのCD9 5 発現促進活性は、アッパーヒンジ、ミドルヒンジが重要であることを示す図である。

図 7 A は、F72をIgG2サブクラスに変換すると、Ramos細胞への結合能は変化しないことを示す図である。

図 7 B は、F72をIgG2サブクラスに変換すると、CD95発現促進活性は上昇することを示す図である。

図 8 A は、4D11抗体のサブクラスをIgG1からIgG4へ変換した場合、Ramos細胞への結合は変化しないことを示す図である。

図 8 B は、4D11抗体のサブクラスをIgG1からIgG4へ変換した場合、CD40LigandによるRamos細胞におけるCD95の発現上昇を同程度阻害することを示す図である。

図 9 は、4D11抗体のサブクラスをIgG1からIgG4、IgG4PEに換えた場合、ADCC活性が低減したことを示す図である。

図 10 は、4D11抗体のサブクラスをIgG1からIgG4Pへ換えた場合、CDC活性が低減したことを示す図である。

図 11 は、4D11G1、4D11G4P、4D11G4PEをhuman CD40トランスジェニックマウスに投与した後の、血中B細胞数の変化（末梢血リンパ球中のB220陽性細胞）を示す図である。

図 12 A は、抗CD40抗体をhuman CD40トランスジェニックマウスに投与した後の、脾臓B細胞のCD23の発現上昇（脾臓B細胞中のCD23陽性細胞）を示す図である。

図 12 B は、抗CD40抗体をhuman CD40トランスジェニックマウスに投与した後の、脾臓B細胞のCD86の発現上昇（脾臓B細胞中のCD86陽性細胞）を示す図である。

図 12 C は、抗CD40抗体をhuman CD40トランスジェニックマウスに投与した後の、脾臓B細胞のCD95の発現上昇（脾臓細胞中のCD95陽性細胞）を示す図である。

図 13 A は、human CD40トランスジェニックマウスにおける4D11、281-1-10による抗原特異的抗体（IgG1）産生抑制活性を示す図である。

図 13 B は、human CD40トランスジェニックマウスにおける4D11、281-1-10による抗原特異的抗体（IgM）産生抑制活性を示す図である。

図 14 A は、抗原特異的抗体産生抑制活性試験時の血中B細胞数（末梢血リンパ球中のB220陽性細胞）を示す図である。

図 14 B は、抗原特異的抗体産生抑制活性試験時の脾臓中B細胞数（脾臓リンパ球中のB220陽性細胞）を示す図である。

図 15 は、カニクイザルに30mg/kgの4D11G4P、4D11G4PEを投与した場合の血中

B細胞数（末梢血リンパ球中のB220陽性細胞）の変化を示す図である。

図16は、図15の試験時の血中IL-12濃度を示す図である。

図17は、4D11G4PEのサルDTH抑制効果（雄力ニクイサルにおける遅延型過敏症）を示す図である。

図18は、図17に結果を示す試験における抗テタヌストキシンIgGの力値を示す図である。

図19は、図17に結果を示す試験における抗テタヌストキシンIgMの力値を示す図である。

図20Aは、4D11G4PEと5C8（抗CD40Ligand抗体）の血小板凝集に対する影響を示す図である。

図20Bは、4D11G4PEと5C8（抗CD40Ligand抗体）の血小板凝集に対する影響を示す図である。

図21は、4D11G4P、4D11G4PE、4D11G2Ser、4D11G4/2/4をpH2.7、37℃でインキュベートした後の、オリゴマー含有率の変化を示す図である。

図22は、抗CD40アゴニスティック抗体による皮膚移植片拒絶抑制作用を示す図である。

図23は、Ramos細胞を移植した担癌マウスに341G2Serを投与した場合の細胞移植後の腫瘍体積の変化を示す図である。

図24は、T24細胞を移植した担癌マウスに341G2Serを投与した場合の細胞移植後の腫瘍体積の変化を示す図である。

図25は、Hs 766T細胞を移植した担癌マウスに341G2Serを投与した場合の細胞移植後の腫瘍体積の変化を示す図である。

図26は、Capan-2細胞を移植した担癌マウスに341G2Serを投与した場合の細胞移植後の腫瘍体積の変化を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

1. アゴニスティック抗体の改変

抗体は本来外来の微生物、ウイルスや癌に対する生体防御機能をつかさどる分子であるため、抗体が結合した細胞を殺傷し、取り除く作用を兼ね備えている。

この殺傷機能は2種類あり、抗体依存性細胞性細胞傷害活性（Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity。以下、ADCCと略記）、及び補体依存性細胞傷害活性（Complement-Dependent Cytotoxicity。以下、CDCと略記）といわれている。

ADCCは、Macrophage, NK細胞、好中球などの表面に発現しているFc Receptorを介して、抗体の定常領域と結合することにより細胞を認識し、認識した細胞が活性化することにより誘導される、細胞障害活性のことを言う。一方、CDCは抗体が抗原と結合することによって、活性化された補体系によって引き起こされる細胞障害活性のことを言う。これらの活性は、抗体のサブクラスによって、その活性の強弱が異なることが解っており、それは、抗体の定常領域の構造の違いに起因することがわかっている（Charles A. Janeway et. al. Immunobiology, 1997, Current Biology Ltd/Garland Publishing Inc.）。

抗CD40アゴニスティック抗体は、免疫活性化という作用メカニズムからADCC, CDCといった、CD40発現細胞の細胞死を引き起こす活性を持たないものが、治療薬としてより好ましいと考えられる。もしも、ADCC、CDC活性によってCD40発現細胞が障害を受けてしまった場合、期待する免疫活性化とは反対の免疫抑制状態になる可能性が考えられ、疾患の増悪をもたらす可能性が考えられる。また、感染症の治療薬として使用する場合、もともと患者のCDC、ADCC活性が亢進している可能性が考えられ、正常のヒト血清や、末梢血を用いた場合、その活性が検出できなかったとしても、より強い活性を持つウサギ補体などを用いて安全性に関して、より慎重に評価する必要がある。そのため、ADCC、CDC活性を持たない変異体や、組換え体を作製しその活性を調べた。

ADCC, CDC活性は、抗体のサブクラスによって活性が異なることが知られているため、ADCC、CDC活性の低減はサブクラスの変換によって可能であると考えられる。たとえば、一般的にヒトIgGサブクラスの中で、IgG 4はADCC、CDC活性が低いサブクラスとして知られており、IgG 2はCDC活性はあるが、ADCC活性は低く、IgG1はADCC、CDC活性の両方とも高いことが報告されている（Charles A. Janeway et. al. Immunobiology, 1997, Current Biology Ltd/Garland Publishing Inc.）。この特徴を生かし、特定のサブクラスを選択することによ

り細胞障害活性の少ない抗体にすることができる。また、特定のサブクラスの抗体と以下に示す点変異の組み合わせによって、目的の活性をもつ抗体を作ることができる。また、ADCC、CDC活性を低減させる方法としては、抗体定常領域に変異を導入することによって可能であることが報告されている。たとえば、L235、D265、D270、K322、P331、P329（アルファベットはアミノ酸の一文字表記。数字はKabatらによるEUインデックス（Kabat et. al., Sequences of proteins of Immunological Interest, 1991 Fifth edition）を示す。以下同様。）は、ヒトIgGの補体活性化能に重要な役割を果たしていると考えられており、この部位を他のアミノ酸に置換することによって、CDC活性を低減できる（Esohe E. Idusogie et. al. J. Immunol. 2000, 164:4178-4184, Yuanyuan Xu et. al. J. Biol. Chem. 1994, 269:3469-3474, Brekke, O.H. et. al. Eur. J. Immunol. 1994, 24:2542, Morgan, A., et. al., Immunology 1995, 86:319, Lund, J., et. al., J. Immunol., 1996, 157:4963, Tao, M. H., et. al., J. Exp. Med. 1993, 178:661）。具体的には、D270、K322、P329、P331をAに置換することにより可能である。また、P331をSやGに変換することによっても可能である。

また、Glu233-Ser239、Gly316-Lys338、Lys274-Arg301、Tyr407-Arg416、Asn297、Glu318、Leu234-Ser239、Asp265-Glu269、Asn297-Thr299、Ala327-Ile332はIgGとFcRの結合に関与していると考えられており（Duncan, A. R., Woof, J. M., Partridge, L. J., Burton, D. R., and Winter, G. (1988) Nature 332, 563-564, Gessner, J. E., Heiken, H., Tamm, A., and Schmidt, R. E. (1998) Ann. Hematol. 76, 231-248, Gavin, A., Hulett, M., and Hogarth, P. M. (1998) in The Immunoglobulin Receptors and Their Physiological and Pathological Roles in Immunity (van de Winkel, J.G.J., and Hogarth, P. M., eds), pp. 11-35, Kluwer Academic Publishers Group, Dordrecht, The Netherlands, Sautes, C. (1997) in Cell-mediated Effects of Immunoglobulins (Fridman, W. H., and Sautes, C., eds), pp. 29-66, R. G. Landes Co., Austin, TX, Da'ron, M. (1997) Annu. Rev. Immunol. 15, 203-234, Canfield, S. M., and Morrison, S. L. (1991) J. Exp. Med. 173, 1483-1491, Chappel, M. S., Isenman, D. E., Everett, M., Xu, Y.-Y., Dorrington,

K. J., and Klein, M. H. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88, 9036-9040、Woof, J. M., Partridge, L. J., Jefferis, R., and Burton, D. R. (1986) Mol. Immunol. 23, 319-330、Wines, B. D., Powell, M. S., Parren, P. W. H. I., Barnes, N., and Hogarth, P. M. (2000) J. Immunol. 164, 5313-5318)、この領域に変異を導入することにより、ADCC活性の低減が可能であると考えられる。具体的にはL235をE、G237をAに置換することにより、FcRとの結合能を低減させることは可能である。

本発明の抗体は、上記のADCCおよび／またはCDC活性を低減させるアミノ酸の変異を1以上、好ましくは1～20個、1～17個、1～16個、1～15個、1～14個、1～13個、1～12個、1～11個、1～10個、1～9個、1～8個、1～7個、1～6個、1～5個、1～4個、1～3個または1もしくは2個有する。

一部の抗CD40抗体に関しては、強力なアゴニスト活性の発現に関してIgG2のヒンジ領域が重要であることが、本発明において示された。したがって、可変領域と、ヒンジ領域以外の定常領域を任意のサブクラスに置換することや、点変異を導入することによって、ADCC、CDC活性の調整のみならず、抗体の生産性の向上、精製および保存時における安定性、血中動態の向上が期待できる。

抗体医薬の生産においては、抗体の精製および保存時の安定性は非常に重要なポイントとなる。いままで開発されている抗体はIgG1サブクラスが最も多いため、上述の抗CD40アゴニスト抗体の物性をより向上させるためには、可変領域とヒンジ領域以外はIgG1サブクラス由来の配列とすることも有効であろう。

本件発明は、以下のアゴニスティック抗CD40抗体変異体等を提供する。

[1] ヒトIgG2のアッパーヒンジおよびミドルヒンジを有し、定常領域にADCCおよび／またはCDCの増加または低減を生じせしめる1以上のアミノ酸の欠失または置換もしくは1以上のアミノ酸が付加されたアゴニスト活性を有するCD40に結合するモノクローナル抗体の重鎖。

[2] 定常領域がヒトIgGである、[1]の重鎖。

[3] ヒトIgGがヒトIgG1である、[2]の重鎖。

[4] ヒトIgGがヒトIgG2である、[2]の重鎖。

[5] ヒトIgGがヒトIgG3である、[2]の重鎖。

- [6] ヒトIgGがヒトIgG4である、[2]の重鎖。
- [7] 定常領域のアミノ酸の置換が、KabatらによるEUインデックスにより示される331位のプロリンのセリンへの置換である、[3]～[5]のいずれかの重鎖。
- [8] [1]～[7]のいずれかの重鎖を含むモノクローナル抗体。
- [9] ハイブリドーマKM341-1-19（受託番号FERM BP-7759）が産生するモノクローナル抗体の重鎖の可変領域を有する、[1]～[7]のいずれかの重鎖。
- [10] [9]の重鎖およびハイブリドーマKM341-1-19（受託番号FERM BP-7759）が産生するモノクローナル抗体の軽鎖の可変領域を有する軽鎖、からなるモノクローナル抗体。
- [11] 配列番号38で表されるポリペプチドの可変領域を有する、[1]～[7]のいずれかの重鎖。
- [12] [11]の重鎖および配列番号40で表されるポリペプチドの可変領域を有するモノクローナル抗体の軽鎖、からなるモノクローナル抗体。
- [13] 配列番号132で表されるポリペプチドからシグナル配列を除いた部分からなる[1]の重鎖。
- [14] [13]の重鎖および配列番号134で表されるポリペプチドからシグナル配列を除いた部分からなるモノクローナル抗体の軽鎖、からなるモノクローナル抗体。
- [15] 配列番号131で表されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主から産生される[1]の重鎖。
- [16] 配列番号131で表されるポリヌクレオチドおよび配列番号133で表されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主から産生される[8]のモノクローナル抗体。
- [17] ハイブリドーマ2105（受託番号FERM BP-8024）が産生するモノクローナル抗体の重鎖の可変領域を有する、[1]～[7]のいずれかの重鎖。
- [18] [17]の重鎖およびハイブリドーマ2105（受託番号FERM BP-8024）が産生するモノクローナル抗体の軽鎖の可変領域を有する軽鎖からなるモノクローナル抗体。
- [19] 配列番号42で表されるポリペプチドの可変領域を有する、[1]～[7]

のいずれかの重鎖。

[2 0] [1 9]の重鎖および配列番号4 4で表されるポリペプチドの可変領域を有するモノクローナル抗体の軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

[2 1] 配列番号136で表されるポリペプチドからシグナル配列を除いた部分からなる[1]の重鎖。

[2 2] [2 1]の重鎖および配列番号138で表されるポリペプチドからシグナル配列を除いた部分からなるモノクローナル抗体の軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

[2 3] 配列番号135で表されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主から産生される[1]の重鎖。

[2 4] 配列番号135で表されるポリヌクレオチドおよび配列番号137で表されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主から産生される[8]のモノクローナル抗体。

[2 5] 配列番号131で表されるポリヌクレオチド。

[2 6] 配列番号133で表されるポリヌクレオチド。

[2 7] [2 5]のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。

[2 8] [2 6]のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。

[2 9] [2 5]および[2 6]のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。

[3 0] [2 7]の発現ベクターを含む宿主。

[3 1] [2 8]の発現ベクターを含む宿主。

[3 2] [2 9]の発現ベクターを含む宿主。

[3 3] [3 0]の宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主からモノクローナル抗体の重鎖を取得する工程を含む、モノクローナル抗体の重鎖を製造する方法。

[3 4] [3 2]の宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主からモノクローナル抗体を取得する工程を含む、モノクローナル抗体を製造する方法。

[3 5] 配列番号135で表されるポリヌクレオチド。

[3 6] 配列番号137で表されるポリヌクレオチド。

[3 7] [3 5]のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。

[3 8] [3 6]のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。

[3 9] [3 5]および[3 6]のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。

[4 0] [3 7]の発現ベクターを含む宿主。

[4 1] [3 8]の発現ベクターを含む宿主。

[4 2] [3 9]の発現ベクターを含む宿主。

[4 3] [4 0]の宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主からモノクローナル抗体の重鎖を取得する工程を含む、モノクローナル抗体の重鎖を製造する方法。

[4 4] [4 2]の宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主からモノクローナル抗体を取得する工程を含む、モノクローナル抗体を製造する方法。

[4 5] ヒトIgG2のアップーヒンジおよびミドルヒンジを有していない抗体のアップーヒンジおよびミドルヒンジを、ヒトIgG2のアップーヒンジおよびミドルヒンジに置換する工程を含む、アゴニスト活性を有するCD40に結合するモノクローナル抗体の重鎖の製造方法。

[4 6] CD40に結合するモノクローナル抗体の重鎖の可変領域のポリペプチドを特定する工程を含む、該可変領域とヒトIgG2のアップーヒンジおよびミドルヒンジを有するモノクローナル抗体の重鎖の製造方法。

[4 7] ヒトIgG2のアップーヒンジおよびミドルヒンジを有していない抗体のアップーヒンジおよびミドルヒンジを、ヒトIgG2のアップーヒンジおよびミドルヒンジに置換する工程を含む、アゴニスト活性を有するCD40に結合するモノクローナル抗体の製造方法。

[4 8] CD40に結合するモノクローナル抗体の重鎖の可変領域のポリペプチドを特定する工程を含む、該可変領域とヒトIgG2のアップーヒンジおよびミドルヒンジを有するモノクローナル抗体の製造方法。

[4 9] [8]、[1 0]、[1 2]、[1 4]、[1 6]、[1 8]、[2 0]、[2 2]および[2 4]のいずれかのモノクローナル抗体を有効成分として含む医薬組成物。

[5 0] 悪性腫瘍、病原体または自己免疫疾患の予防または治療に用いられる、[4 9]の医薬組成物。

[5 1] [4 9]の医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む、悪性腫瘍、病原

体または自己免疫疾患を予防または治療する方法。

[52] 悪性腫瘍、病原体または自己免疫疾患の予防または治療に用いられる医薬組成物を製造するための、[8]、[10]、[12]、[14]、[16]、[18]、[20]、[22]および[24]のいずれかのモノクローナル抗体の使用。

[89] 配列番号131で表されるポリヌクレオチドからシグナル配列をコードする部分を除いた、ポリヌクレオチド。

[90] 配列番号133で表されるポリヌクレオチドからシグナル配列をコードする部分を除いた、ポリヌクレオチド。

[91] 配列番号135で表されるポリヌクレオチドからシグナル配列をコードする部分を除いた、ポリヌクレオチド。

[92] 配列番号137で表されるポリヌクレオチドからシグナル配列をコードする部分を除いた、ポリヌクレオチド。

また、本件発明は、ヒトIgG2に属するアゴニスト抗CD40抗体に改変を加えた抗体であって、アッパーヒンジおよびミドルヒンジ領域以外の定常領域が他のサブクラス由来の配列に置換された変異体を提供する。好ましい他のサブクラスはIgG1である。また、本件発明は、ヒトIgG2に属するアゴニスト抗CD40抗体に改変を加えた抗体であって、ヒンジ領域以外の定常領域が他のサブクラス由来の配列に置換された変異体を提供する。好ましい他のサブクラスはIgG1である。

ここで、ADCC活性およびCDC活性が低下しているとは、上記変異体でない、抗CD40モノクローナル抗体に比べて、ADCC活性およびCDCが低下していることをいい、例えば、ハイブリドーマKM341-1-19（受託番号FERM BP-7759）もしくは2105（受託番号FERM BP-8024）が産生するモノクローナル抗体に比べてADCC活性およびCDCが低下していることをいう。ADCC活性およびCDC活性は公知の方法により測定することができ、例えば本明細書の実施例に記載の方法で測定すればよい。ハイブリドーマKM341-1-19（受託番号FERM BP-7759）もしくは2105（受託番号FERM BP-8024）が産生するモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖可変領域配列は以下に示すとおりである。

KM341-1-19抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域をコードするDNA並びに重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

KM341-1-19抗体 の重鎖塩基配列（配列番号 37）における、シグナル配列は50番目のアデニン（A）から始まる。シグナル配列と可変領域の境界は109番目の[アデニン]（[A]）と110番目のシトシン（C）の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は493番目のアデニン（A）と494番目のグアニン（G）の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver. 2）を使用）。

KM341-1-19抗体 の重鎖アミノ酸配列（配列番号 38）における、シグナル配列と可変領域の境界は20番目のセリン（S）と21番目のグルタミン（Q）の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は148番目のセリン（S）と149番目のアラニン（A）の間に位置する。

以上より、KM341-1-19抗体 の重鎖可変領域の塩基配列は、配列番号 37 における110番目のシトシン（C）から493番目のアデニン（A）までである。また、KM341-1-19抗体 の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 38 における21番目のグルタミン（Q）から148番目のセリン（S）までである。

KM341-1-19抗体の軽鎖塩基配列（配列番号 39）における、シグナル配列は、29番目のアデニン（A）から始まる。シグナル配列と可変領域の境界は88番目の[アデニン]（[A]）と89番目のグアニン（G）の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は400番目のアデニン（A）と401番目の[シトシン]（[C]）の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver. 2）を使用）。

KM341-1-19抗体の軽鎖アミノ酸配列（配列番号 40）における、シグナル配列と可変領域の境界は20番目のグリシン（G）と21番目のグルタミン酸（E）の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は124番目のリジン（K）と125番目の[アルギニン]（[R]）の間に位置する。

以上より、KM341-1-19抗体の軽鎖可変領域の塩基配列は、配列番号 39 における89番目のグアニン（G）から400番目のアデニン（A）までである。また、KM341-1-19抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 40 における21番目のグルタミン酸（E）から124番目のリジン（K）までである。

KM341-1-19抗体 重鎖塩基配列（配列番号 37）：

GTCGACGCTGAATTCTGGCTGACCAGGGCAGCCACCAGAGCTCCAGACAATGTCTGTCTCCTTCCTCATCTT
CCTGCCCCGTGCTGGGCCTCCCATGGGGTGTCTGTCTCACAGGTCCAAGTGCAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGT

GAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGTGTCTCTAGCAACAGTGCTACTTG
GAACTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGACCTTGAGTGGCTGGGAAGGACATACTACAGGTCCAAGTGGA
TCGTGATTATGTAGGATCTGTGAAAAGTCGAATAATCATCAACCCAGACACATCCAACAACCAGTTCTCCCT
GCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTATATATTACTGTACAAGAGCACAGTGGCTGGGAGGGGA
TTACCCCTACTACTACAGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCTTCAGCCTCCACCAA
GGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCT
GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACAC
CTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTT
CGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCG
CAAATGTTGTGTCGAGTGCCCACCGTGCCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC
AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
AGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGA
GGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAA
GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGG
GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCCT
GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAA
CAACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCAGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA
CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC
GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGGATCC

KM341-1-19抗体 重鎖アミノ酸配列 (配列番号 3 8)

MSVSFLIFLPVLGLPWGVLQVQLQQSGPGLVKPSQTLSTCAISGDSVSSNSATWNWIRQSPSRDLEWLGR
TYYRSKWYRDYVGSVKSRIIINPDTSNNQFSLQLNSVTPEDTAIYYCTRAQWLGGDYPYYYSMDVWGQGTIV
TVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIE
KTI SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFF
LYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

KM341-1-19抗体 軽鎖塩基配列（配列番号 39）：

ACTGCTCAGTTAGGACCCAGAGGGAACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCT
CCCAGATACCAACCGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGC
CACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGC
TCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTC
TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCG
TAGCAACACTTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGTACG

KM341-1-19抗体 軽鎖アミノ酸配列（配列番号 40）

MEAPAQLLFLLLLWLPDITGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS
NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISILEPEDFAVYYCQQRSTFGPGTKVDIKRT

2105抗体の重鎖及び軽鎖可変領域をコードするDNA並びに重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

2105抗体 の重鎖塩基配列（配列番号 41）における、シグナル配列は70番目のアデニン（A）から始まる。シグナル配列と可変領域の境界は126番目の[チミン]（[T]）と127番目のグアニン（G）の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は495番目のアデニン（A）と496番目のグアニン（G）の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver. 2）を使用）。

2105抗体の重鎖アミノ酸配列（配列番号 42）における、シグナル配列と可変領域の境界は19番目のシステイン（C）と20番目のグルタミン酸（E）の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は142番目のセリン（S）と143番目のアラニン（A）の間に位置する。

以上より、2105抗体 の重鎖可変領域の塩基配列は、配列番号 41 における127番目のグアニン（G）から495番目のアデニン（A）までである。また、2105抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 42 における20番目のグルタミン酸（E）から142番目のセリン（S）までである。

2105抗体の軽鎖塩基配列（配列番号 43）における、シグナル配列は、28番目のアデニン（A）から始まる。シグナル配列と可変領域の境界は87番目の[アデニ

ン] ([A]) と88番目のグアニン (G) の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は405番目のアデニン (A) と406番目の[シトシン] ([C]) の間に位置する (遺伝子配列予測ソフトウェア (Signal P ver. 2) を使用)。

2105抗体の軽鎖アミノ酸配列 (配列番号44) における、シグナル配列と可変領域の境界は20番目のグリシン (G) と21番目のグルタミン酸 (E) の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は126番目のリジン (K) と127番目の[アルギニン] ([R]) の間に位置する。

以上より、2105抗体の軽鎖可変領域の塩基配列は、配列番号43における88番目のグアニン (G) から405番目のアデニン (A) までである。また、2105抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号44における21番目のグルタミン酸 (E) から126番目のリジン (K) までである。

2105抗体 重鎖塩基配列 (配列番号: 41)

CTGAACACAGACCCGTCGACTCCAGGTGTTTCCATTTCAGTGATCAGCACTGAACACAGAGGACTCACCATG
GAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTTTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTGGAG
TCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGAT
GATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGGAAT
AGTGGTAGCTTGGTGCATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCC
CTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAGAGATAGGCTATTT
CGGGGAGTTAGGTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCACC
AAGG

2105抗体 重鎖アミノ酸配列 (配列番号: 42)

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISW
NSGSLVHADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDRLFRGVRYYGMDVWGQGTITVTVSSAS
TK

2105抗体 軽鎖塩基配列 (配列番号: 43)

CTGCTCAGTTAGGACCCAGAGGGAACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTC

CCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCC
 ACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCT
 CCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCT
 GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGT
 AGCCACTGGCTCACTTTCGGCGGGGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGTACGGTG

2105抗体 軽鎖アミノ酸配列（配列番号：44）

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS
 NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSHWLTFGGGTKVEIKRTV

341G2Serの重鎖塩基配列（配列番号131）における、シグナル配列と可変領域の境界は60番目の[アデニン]([A])と61番目のシトシン(C)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は444番目のアデニン(A)と445番目のグアニン(G)の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver. 2）を使用）。

341G2Serの重鎖アミノ酸配列（配列番号132）における、シグナル配列と可変領域の境界は20番目のセリン(S)と21番目のグルタミン(Q)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は148番目のセリン(S)と149番目のアラニン(A)の間に位置する。

以上より、341G2Serの重鎖可変領域の塩基配列は、配列番号131における61番目のシトシン(C)から444番目のアデニン(A)までである。また、341G2Serの重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号132における21番目のグルタミン(Q)から148番目のセリン(S)までである。

341G2Ser重鎖全塩基配列（配列番号：131）

ATGTCGTCTCCTTCCTCATCTTCCTGCCCCTGCTGGGCCTCCCATGGGGTGTCTGTACAGGTCCAACTG
 CAGCAGTCAGGTCCAGGACTGGTGAAGCCCTCGCAGACCCTCTCACTCACCTGTGCCATCTCCGGGGACAGT
 GTCTCTAGCAACAGTGCTACTTGGAAGTGGATCAGGCAGTCCCCATCGAGAGACCTTGAGTGGCTGGGAAGG
 ACATACTACAGGTCCAAGTGGTATCGTGATTATGTAGGATCTGTGAAAAGTCGAATAATCATCAACCCAGAC
 ACATCCAACAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACTCTGTGACTCCCGAGGACACGGCTATATATTACTGTACA

AGAGCACAGTGGCTGGGAGGGGATTACCCCTACTACTACAGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTC
 ACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAG
 AGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGC
 GCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
 GTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACC
 AAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACCTGTGGCAGGA
 CCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGC
 GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTG
 CACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCTCCATCGAG
 AAAACCATCTCCAAAACCAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
 ATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
 GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
 CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
 GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

341G2Sser重鎖全アミノ酸配列（配列番号：1 3 2）

MSVSFLIFLPVLGLPWGVL SQVQLQQSGPLVKPSQTL SLTCAISGDSVSSNSATWNWIRQSPSRDLEWLGR
 TYYRSKWYRDYVGSVKSR I I INPDTSNNQFSLQLNSVTPEDTAIYYCTRAQWLGGDYPYYYSMDVWGQGTIV
 TVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTVPSSNFGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKTV ERKCCVECP PCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPASIE
 KTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

341G2Serの軽鎖塩基配列（配列番号1 3 3）における、シグナル配列と可変領域の境界は60番目の[アデニン]([A])と61番目のグアニン(G)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は372番目のアデニン(A)と373番目の[シトシン]([C])の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver. 2）を使用）。

341G2Serの軽鎖アミノ酸列（配列番号134）における、シグナル配列と可変領域の境界は20番目のグリシン (G) と21番目のグルタミン酸 (E) の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は124番目のリジン (K) と125番目の[アルギニン] ([R]) の間に位置する。以上より、341G2Serの軽鎖可変領域の塩基配列は、配列番号133における61番目のグアニン (G) から372番目のアデニン (A) までである。また、341G2Serの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号134における21番目のグルタミン酸 (E) から124番目のリジン (K) までである。

341G2Ser軽鎖全塩基配列（配列番号：133）

ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGAGAAATTGTGTTG
ACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGT
GTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCC
AACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGC
AGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACACTTTCGGCCCTGGGACCAAA
GTGGATATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT
GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGAT
AACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC
AGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCCAAGTCACCCATCAG
GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA

341G2Ser軽鎖全アミノ酸配列（配列番号：134）

MEAPAQLLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS
NRATGIPARFSGSGGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQQRSNTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC

2105G2Serの重鎖塩基配列（配列番号135）における、シグナル配列と可変領域の境界は57番目の[チミン] ([T]) と58番目のグアニン (G) の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は426番目のアデニン (A) と427番目のグアニン (G) の間に

位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver. 2）を使用）。

2105G2Serの重鎖アミノ酸列（配列番号136）における、シグナル配列と可変領域の境界は19番目のシステイン(C)と20番目のグルタミン酸(E)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は142番目のセリン(S)と143番目のアラニン(A)の間に位置する。

以上より、2105G2Serの重鎖可変領域の塩基配列は、配列番号135における58番目のグアニン(G)から426番目のアデニン(A)までである。また、2105G2Serの重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号136における20番目のグルタミン酸(E)から142番目のセリン(S)までである。

2105G2Ser重鎖全塩基配列（配列番号：135）

ATGGAGTTGGGACTGAGCTGGATTTTCCTTTTGGCTATTTTAAAAGGTGTCCAGTGTGAAGTGCAGCTGGTG
GAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTT
GATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTAGTTGG
AATAGTGGTAGCTTGGTGCATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAC
TCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAGAGATAGGCTA
TTTCGGGGAGTTAGGTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC
ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGC
TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCTCTGACCAGCGGCGTG
CACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCCAGC
AACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTT
GAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCCAACCGTGCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTCTCTTC
CCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACCGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCA
CGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGCTGAAC
GGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACC
AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTC
AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
GAGAACAACCTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC

GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC
TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

2105G2Ser重鎖全アミノ酸配列（配列番号：136）

MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISW
NSGSLVHADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDRLFRGVRYYGMDVWGQGTTVTVSSAS
TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
NFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
HEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPASIEKTI SKT
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

2105G2Serの軽鎖塩基配列（配列番号137）における、シグナル配列と可変領域の境界は60番目の[アデニン]([A])と61番目のグアニン(G)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は378番目のアデニン(A)と379番目の[シトシン]([C])の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver. 2）を使用）。

2105G2Serの軽鎖アミノ酸配列（配列番号138）における、シグナル配列と可変領域の境界は20番目のグリシン(G)と21番目のグルタミン酸(E)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は126番目のリジン(K)と127番目の[アルギニン]([R])の間に位置する。以上より、2105G2Serの軽鎖可変領域の塩基配列は、配列番号137における61番目のグアニン(G)から378番目のアデニン(A)までである。また、2105G2Serの軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号138における21番目のグルタミン酸(E)から126番目のリジン(K)までである。

2105G2Ser軽鎖全塩基配列（配列番号：137）

ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGATACCACCGGAGAAATTGTGTTG
ACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGT
GTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCC
AACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGC

AGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCCACTGGCTCACTTTCGGCGGGGGG
 ACCAAGGTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTG
 AAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAG
 GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTAC
 AGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACC
 CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA

2105G2Ser軽鎖全アミノ酸配列（配列番号：138）

MEAPAQLLFLLLWLPD TTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS
 NRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYCQQRSHWLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL
 KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT
 HQGLSSPVT KSFNRGEC

2. アンタゴニスティック抗体の改変

抗CD40アンタゴニスティック抗体に関しても、アゴニスティック抗体と同様に、その作用メカニズムからADCC活性、CDC活性がないことが医薬品としてより好ましいと考えられる。さらに、アンタゴニスティック抗体の場合、ADCC活性が検出できない場合においても、in vivoでのFc receptorを介した抗体の架橋によって、シグナルを誘導する活性を回避することが重要となる。言い換えれば、in vivoにおいて免疫を活性化しないことを確認することが必要となり、そのような活性をもつ抗体が医薬品としては、必要であると考えられる。抗CD40アンタゴニスト抗体は、自己免疫疾患や臓器移植拒絶などの治療薬として期待されているが、もしも、抗体投与後に何らかの働きで、微弱でもアゴニスト活性を誘導してしまうことがあった場合、症状の増悪をもたらす、期待した治療効果の反対の結果となる可能性が考えられるため、アゴニスト活性が全くない抗体が医薬品としてはより好ましい。本発明においては、サルを用いた試験により、in vivoにおいてもアゴニスト活性をより低減させるためには、IgG4に点変異L235E（235番目のLをEに置換することを意味する。以下同様。）を導入することが有効であることを示した。また、ADCC、CDC活性が低い抗体サブクラスとして、IgG4が挙げられるが、

IgG4は組換え蛋白質としてCHOなどの細胞で発現させる場合、重鎖間のSS結合の形成が不十分で、半量体が分泌されることが報告されている (Rob C. Aalberse et. al., Immunology, 105, 9-19, 2002)。このため、抗体定常領域に変異を導入することにより、SS結合の形成を促進できることが報告されており、この変異の有用性に関しても評価した。具体的には、228番目のSをPに置換する変異を導入した (S. Angal et. al., Molecular Immunology, vol30, no1, 105-108, 1993)。

アゴニスト抗体と同様にアンタゴニスト抗体においても、抗体の精製保存時の安定性は非常に重要なポイントとなる。いくつかの方法により、アンタゴニスト活性を保持しつつ、より物性的に優れた抗体を作製することが可能であると考えられる。現在までに市販されている抗体医薬品は、IgG1サブクラスに属するものがほとんどを占め、製剤上の問題点は特に報告されていない。このことから、抗体の定常領域がIgG1であることが物性的には有利である可能性が考えられる。しかし、抗CD40アンタゴニスト抗体の場合は、ADCC、CDC活性が低減されたものが望ましい。このため、IgG1の定常領域にいくつかの点変異を導入したものが望まれる。方法としては、上述した変異を導入することにより可能となる。例えば、P331G点変異を導入することにより、ADCC、CDC活性を低減させた、IgG1定常領域を作ることが可能であると考えられる。また、IgG4に点変異L235Eを導入することにより、in vivoにおいて、微弱なアゴニスト活性が消失し、薬効的には優れた活性を示すが、物性面では低pHにおける安定性が低下するという減少が見られている。このため、L235をE以外の別のアミノ酸に置換することにより、物性面での機能向上が期待できる。また、4D11抗体については、その可変領域の構造が非常に類似している2B11抗体がある。2B11抗体は、アンタゴニスト活性は、4D11抗体に劣るが、低pHにおける安定性は4D11抗体に勝る。このことを利用し、可変領域の2B11由来のアミノ酸の一部を4D11抗体に導入することによって、安定性を向上させることは可能であると考えられる。具体的には、重鎖のL38V、P58R、G62W、I79M、K81Y、H87Y、S98A、K109R、V120M、T124Aおよび、軽鎖のN75Sの点変異とその組み合わせによって、可能であると考えられる。具体的には、4D11抗体重鎖可変領域の38番目LをVに置換した変異体 (L38Vと略記。以

下同様)、P58R変異体、G62W変異体、I79M変異体、K81Y変異体、H87Y変異体、S98A変異体、K109R変異体、V120M変異体、T124A変異体、および、軽鎖のN75S変異体、または前述の点変異の組み合わせによって、可能であると考えられる。

本発明の抗体は、上記のADCCおよび/またはCDC活性を低減させるアミノ酸の変異を1以上、好ましくは1~15個、1~13個、1~12個、1~11個、1~10個、1~9個、1~8個、1~7個、1~6個、1~5個、1~4個、1~3個または1もしくは2個有する。

本件発明は、以下のアンタゴニスティック抗CD40抗体変異体等を提供する。

[5 3] 定常領域にADCCおよび/またはCDCの増加または低減を生じせしめる1以上のアミノ酸の欠失または置換もしくは1以上のアミノ酸が付加されたアンタゴニスト活性を有するCD40に結合するモノクローナル抗体の重鎖。

[5 4] 定常領域がヒトIgGである、[5 3]の重鎖。

[5 5] ヒトIgGがヒトIgG1である、[5 4]の重鎖。

[5 6] ヒトIgGがヒトIgG2である、[5 4]の重鎖。

[5 7] ヒトIgGがヒトIgG3である、[5 4]の重鎖。

[5 8] ヒトIgGがヒトIgG4である、[5 4]の重鎖。

[5 9] 定常領域のアミノ酸の置換が、KabatらによるEUインデックスにより示される235位のロイシンからグルタミン酸への置換である、[5 5]、[5 7]および[5 8]のいずれかの重鎖。

[6 0] 定常領域に、重鎖どうしのSS結合形成を促進させる1以上のアミノ酸の欠失または置換もしくは1以上のアミノ酸が付加されている、[5 3]~[5 8]のいずれかの重鎖。

[6 1] 定常領域のアミノ酸の置換が、KabatらによるEUインデックスにより示される228位のセリンからプロリンへの置換である、[6 0]の抗体の重鎖。

[6 2] [5 3]~[6 1]のいずれかの重鎖を含むモノクローナル抗体。

[6 3] ハイブリドーマ4D11 (受託番号FERM BP-7758) が産生するモノクローナル抗体の重鎖の可変領域を有する、[5 3]~[6 1]のいずれかの重鎖。

[6 4] [6 3]の重鎖およびハイブリドーマ4D11 (受託番号FERM BP-7758) が産生するモノクローナル抗体の軽鎖の可変領域を有する軽鎖、からなるモノク

ローナル抗体。

[6 5] 配列番号 4 6 で表されるポリペプチドの可変領域を有する、[5 3]～[6 1]のいずれかの重鎖。

[6 6] [6 5]の重鎖および配列番号 4 8 で表されるポリペプチドの可変領域を有するモノクローナル抗体の軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

[6 7] 配列番号140で表されるポリペプチドからシグナル配列を除いた部分からなる[5 3]の重鎖。

[6 8] [6 7]の重鎖および配列番号142で表されるポリペプチドからシグナル配列を除いた部分からなるモノクローナル抗体の軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

[6 9] 配列番号139で表されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主から産生される[5 3]の重鎖。

[7 0] 配列番号139で表されるポリヌクレオチドおよび配列番号141で表されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主から産生される[6 2]のモノクローナル抗体。

[7 1] 配列番号139で表されるポリヌクレオチド。

[7 2] 配列番号141で表されるポリヌクレオチド。

[7 3] [7 1]のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。

[7 4] [7 2]のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。

[7 5] [7 1]および[7 2]のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。

[7 6] [7 3]の発現ベクターを含む宿主。

[7 7] [7 4]の発現ベクターを含む宿主。

[7 8] [7 5]の発現ベクターを含む宿主。

[7 9] [7 6]の宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主からモノクローナル抗体の重鎖を取得する工程を含む、モノクローナル抗体の重鎖を製造する方法。

[8 0] [7 8]の宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主からモノクローナル抗体を取得する工程を含む、モノクローナル抗体を製造する方法。

[8 1] [6 2]、[6 4]、[6 6]、[6 8]および[7 0]のいずれかのモノクロー

ナル抗体を有効成分として含む医薬組成物。

[8 2] 移植拒絶、自己免疫疾患、アレルギーまたは血液凝固第Ⅷ因子阻害症候群の予防または治療に用いられる、[8 1]の医薬組成物。

[8 3] [8 1]の医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む、移植拒絶、自己免疫疾患、アレルギーまたは血液凝固第Ⅷ因子阻害症候群を予防または治療する方法。

[8 4] 移植拒絶、自己免疫疾患、アレルギーまたは血液凝固第Ⅷ因子阻害症候群の予防または治療に用いられる医薬組成物を製造するための、[6 2]、[6 4]、[6 6]、[6 8]および[7 0]のいずれかのモノクローナル抗体の使用。

[8 5] ヒト抗体の重鎖定常領域に1以上のアミノ酸の欠失または置換もしくは1以上のアミノ酸を付加する工程を含む、アゴニスティック活性が低減されたアンタゴニスト活性を有するCD40に結合するモノクローナル抗体の重鎖の製造方法。

[8 6] 定常領域がヒトIgGである、[8 5]の方法。

[8 7] ヒトIgGがヒトIgG4である、[8 6]の方法。

[8 8] 定常領域のアミノ酸の置換が、KabatらによるEUインデックスにより示される235位のロイシンからグルタミン酸への置換である、[8 5]～[8 7]のいずれかの方法。

[9 3] 配列番号139で表されるポリヌクレオチドからシグナル配列をコードする部分を除いた、ポリヌクレオチド。

[9 4] 配列番号141で表されるポリヌクレオチドからシグナル配列をコードする部分を除いた、ポリヌクレオチド。

その他、本発明は以下のものを提供する。

ハイブリドーマ4D11（受託番号FERM BP-7758）の産生するモノクローナル抗体の重鎖可変領域の38番目LのVへの置換、58番目PのRへの置換、62番目GのWへの置換、79番目IのMへの置換、81番目KのYへの置換、87番目HのYへの置換、98番目SのAへの置換、109番目KのRへの置換、120番目VのMへの置換、124番目TのAへの置換からなる群から選択される少なくとも一つの置換を含む上記のアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体、ならびに4D11抗体軽鎖可変領域の75番目NをSに置換した上記上記のアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体。

ここで、ADCC活性およびCDC活性が低下しているとは、上記変異体でない、抗CD40モノクローナル抗体に比べて、ADCC活性およびCDCが低下していることをいい、例えば、ハイブリドーマ4D11（受託番号FERM BP-7758）の産生するモノクローナル抗体に比べてADCC活性およびCDCが低下していることをいう。ADCC活性およびCDC活性は公知の方法により測定することができ、例えば本明細書の実施例に記載の方法で測定すればよい。ハイブリドーマ4D11（受託番号FERM BP-7758）の産生するモノクローナル抗体の重鎖および軽鎖可変領域配列は以下に示すとおりである。

4 D11抗体の重鎖及び軽鎖可変領域をコードするDNA並びに重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列をそれぞれ以下に示す。

4 D11抗体の重鎖塩基配列（配列番号 4 5）における、シグナル配列と可変領域の境界は93番目の[シトシン] ([C])と94番目のシトシン (C) の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は456番目のアデニン (A) と457番目のグアニン (G) の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver. 2）を使用）。

4 D11抗体の重鎖アミノ酸列（配列番号 4 6）における、シグナル配列と可変領域の境界は26番目のセリン (S) と27番目のグルタミン (Q) の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は147番目のセリン (S) と148番目のアラニン (A) の間に位置する。

以上より、4 D11抗体の重鎖可変領域の塩基配列は、配列番号 4 5における94番目のシトシン (C) から456番目のアデニン (A) までである。また、4 D11抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 4 6における27番目のグルタミン (Q) から147番目のセリン (S) までである。

4 D11抗体の軽鎖塩基配列（配列番号 4 7）における、シグナル配列と可変領域の境界は124番目の[チミン] ([T])と125番目のグアニン (G) の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は442番目のアデニン (A) と443番目の[シトシン] ([C]) の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver. 2）を使用）。

4 D11抗体の軽鎖アミノ酸列（配列番号 4 8）における、シグナル配列と可変領域の境界は22番目のシステイン (C) と23番目のアラニン (A) の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は128番目のリジン (K) と129番目の[アルギニン] ([R]) の間

に位置する。

以上より、4D11抗体の軽鎖可変領域の塩基配列は、配列番号47における125番目のグアニン(G)から442番目のアデニン(A)までである。また、4D11抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号48における23番目のアラニン(A)から128番目のリジン(K)までである。

4D11抗体 重鎖塩基配列(配列番号: 45)

ATATGTCGACGAGTCATGGATCTCATGTGCAAGAAAATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCG
GCTCCCAGATGGGTCTGTCCCAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTACTGAAGCCTTCGGAGACC
CTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGCGGCTCCATCAGCAGTCCTGGTTACTACGGGGGCTGGATCCGCCAG
CCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATAAAAGTGGGAGCACCTACCACAACCCGTCCCTC
AAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCC
GCAGACACGGCTGTGTATTACTGTACGAGACCTGTAGTACGATATTTGGGTGGTTCGACCCCTGGGGCCAG
GGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC

4D11抗体 重鎖アミノ酸配列(配列番号: 46)

MDLMCKMKHLWFFLLLVAAPRWVLSQLQLQESGPGLLKPSSETLSLTCTVSGGSISSPGYYGGWIRQPPGKG
LEWIGSIYKSGSTYHNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCTRPVVRVYFGWFDPWGQGLVTV
VSSAS

4D11抗体 軽鎖塩基配列(配列番号: 47)

AGATCTTAAGCAAGTGTAACAACCTCAGAGTACGCGGGGAGACCCACTCAGGACACAGCATGGACATGAGGGT
CCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCATCCAGTTGACCCAGTC
TCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAG
TGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAATTTGGA
AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA
GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGT
GGAAATCAAACGTACG

4D11抗体 軽鎖アミノ酸配列（配列番号：48）

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYD
ASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSTPTFGQGTKVEIKRT

4D11抗体G4PEの重鎖塩基配列（配列番号139）における、シグナル配列と可変領域の境界は78番目の[シトシン]([C])と79番目のシトシン(C)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は441番目のアデニン(A)と442番目のグアニン(G)の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver. 2）を使用）。

4D11抗体の重鎖アミノ酸配列（配列番号140）における、シグナル配列と可変領域の境界は26番目のセリン(S)と27番目のグルタミン(Q)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は147番目のセリン(S)と148番目のアラニン(A)の間に位置する。

以上より、4D11抗体の重鎖可変領域の塩基配列は、配列番号139における79番目のシトシン(C)から441番目のアデニン(A)までである。また、4D11抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号140における27番目のグルタミン(Q)から147番目のセリン(S)までである。

4D11G4PE重鎖全塩基配列（配列番号：139）

ATGGATCTCATGTGCAAGAAAATGAAGCACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCGGCTCCCAGATGGGTC
CTGTCCCAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTACTGAAGCCTTCGGAGACCTGTCCCTCACCTGC
ACTGTCTCTGGCGGCTCCATCAGCAGTCCTGGTTACTACGGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCAGGGAAGGGG
CTGGAGTGGATTGGGAGTATCTATAAAAGTGGGAGCACCTACCACAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACC
ATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGAGACACGGCTGTG
TATTACTGTACGAGACCTGTAGTACGATATTTTGGGTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACC
GTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGC
ACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGGGCC
CTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG
ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAG
GTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCAGCACCTGAGTTCGAGGGGGGA

CCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGC
 GTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCAT
 AATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTG
 CACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAG
 AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAG
 ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
 GAGAGCAATGGGCAGCCGGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC
 CTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
 GAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA

4 D11G4PE重鎖全アミノ酸配列（配列番号：140）

MDLMCKMKHLWFFLLVAAPRWVLSQLQLQESGPGLLPSETLSLTCTVSGSISPPGYGGWIRQPPGKG
 LEWIGSIYKSGSTYHNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCTRPVVRYPFGWFDPWGQGLVT
 VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 TVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE
 KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF
 LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHENHNTQKSLSLSLGK

4D11G4PEの軽鎖塩基配列（配列番号141）における、シグナル配列と可変領域の境界は66番目の[チミン]([T])と67番目のグアニン(G)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は384番目のアデニン(A)と385番目の[シトシン]([C])の間に位置する（遺伝子配列予測ソフトウェア（Signal P ver. 2）を使用）。

4D11G4PEの軽鎖アミノ酸配列（配列番号142）における、シグナル配列と可変領域の境界は22番目のシステイン(C)と23番目のアラニン(A)の間に位置し、可変領域と定常領域の境界は128番目のリジン(K)と129番目の[アルギニン]([R])の間に位置する。

以上より、4D11G4PEの軽鎖可変領域の塩基配列は、配列番号141における67番目のグアニン(G)から384番目のアデニン(A)までである。また、4D11G4PEの軽

鎖可変領域のアミノ酸配列は、配列番号 1 4 2 における23番目のアラニン (A) から128番目のリジン (K) までである。

4D11G4PE軽鎖全塩基配列（配列番号：1 4 1）

ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGCCATC
CAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGT
CAGGGCATTAGCAGTGCTTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGAT
GCCTCCAATTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACC
ATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCGACGTTCCGGC
CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAG
CAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG
TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC
ACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA
GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA

4D11G4PE軽鎖全アミノ酸配列（配列番号：1 4 2）

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYD
ASNLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTYPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

3. 定義

本明細書で使用する用語の定義は以下のとおりである。

本発明でいう「CD40」とは、クラークら (E. A. Clark et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 4494, 1986) 又はスタメンコビックら (I. Stamenkovic et. al., EMBO J. 8:1403, 1989) により示されているアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味し、特にB細胞、DC、マクロファージ、内皮細胞、上皮細胞、あるいはそれらの腫瘍細胞表面に発現する抗原ポリペプチドである。

「抗CD40抗体」とは、細胞発現CD40、全長CD40又は部分長CD40に対するモノクローナル抗体のいずれをも意味する。

さらに、本発明で「抗体」とは、イムノグロブリンを構成する重鎖可変領域及び重鎖定常領域並びに軽鎖の可変領域及び軽鎖の定常領域をコードする遺伝子（「抗体遺伝子」と総称する）に由来するものである。ヒトのイムノグロブリンには、IgG、IgA、IgM、IgDおよびIgEからなる5つの異なったクラスが存在する。IgGはさらにIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4からなる4つのサブクラス、またIgAはさらにIgA1およびIgA2からなる2つのサブクラスに分類することが出来る。IgG1、IgG2、IgG3、IgG4はヒト染色体の14q32.33に位置する。イムノグロブリンの基本構造は、2本の相同なL鎖（軽鎖）と、2本の相同なH鎖（重鎖）から成り立っている。免疫グロブリンのクラスとサブクラスはH鎖によって決定される。本発明の抗体には、いずれのイムノグロブリンクラス・サブクラス及びアイソタイプを有する抗体をも包含する。本発明における抗体の「機能的断片」とは、前記で定義した抗体の一部分（部分断片）であって、抗体の抗原への作用を1つ以上保持するものを意味し、具体的にはF(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、ジスルフィド結合FV、一本鎖FV(scFV)、およびこれらの重合体等が挙げられる（D.J.King., Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies., 1998 T.J. International Ltd）。

これまでに知られているIgG1としてはJ00228、Z17370またはY14737などが、IgG2としてはJ00230、AJ250170、AF449616、AF449617、AF449618、Z49802またはZ49801などが、IgG3としてはM12958、K01313、X16110、X99549、AJ390236、AJ390237、AJ390238、AJ390241、AJ390242、AJ390246、AJ390247、AJ390252、AJ390244、AJ390254、AJ390260、AJ390262、AJ390272、AJ390276またはAJ390279などが、IgG4としてはK01316、AJ001563、AJ001564などが挙げられる（以上の記号は遺伝子のアクセッション番号である）。

本発明における、CH1、ヒンジ、CH2、CH3とは、抗体重鎖定常領域の一部分を示しており、KabatらのEUインデックス（Kabat et. al., Sequences of proteins of immunological interest, 1991 Fifth edition）に基づいている。CH1は、EUインデックス118から215、ヒンジはEUインデックス216から230、CH2はEUインデックス231から340、CH3はEUインデックス341から446と定義される。

本発明で「ヒト抗体」とは、ヒト由来の抗体遺伝子の発現産物である抗体を意

味する。

「アゴニスティック」とは、B細胞、腫瘍細胞又は樹状細胞などの細胞表面上に発現するCD40に、そのリガンドが結合することを促進する作用、あるいは、CD40リガンドがCD40発現細胞に与える影響の1つ以上を、CD40を発現する細胞に与える作用を意味し、「アゴニスティック抗体」とは、そのようなアゴニスティック作用を有する抗体を意味する。CD40発現細胞に与える影響の1つとして、例えばCD95の発現促進が挙げられる。

「アンタゴニスティック」とは、B細胞、腫瘍細胞又は樹状細胞などの細胞表面上に発現するCD40にそのリガンドが結合することを阻害する作用、あるいは、CD40リガンドがCD40発現細胞に与える影響の1つ以上を中和する作用を意味し、「アンタゴニスティック抗体」とはそのような作用を有する抗体を意味する。CD40発現細胞に与える影響の1つとして、例えばB細胞増殖抑制あるいは抗体産生抑制が挙げられる。

本出願において、アミノ酸配列によって抗体またはその重鎖可変領域若しくは軽鎖可変領域を明示しているが、1以上、好ましくは1～10個、1～9個、1～8個、1～7個、1～6個、1～5個、1～4個、1～3個または1もしくは2個のアミノ酸が欠失した、あるいは置換された、若しくは付加されたものも本発明の範疇に含まれる。

本出願において、塩基配列によって抗体またはその重鎖可変領域若しくは軽鎖可変領域をコードする遺伝子を明示しているが、1以上、好ましくは1～10個、1～9個、1～8個、1～7個、1～6個、1～5個、1～4個、1～3個または1もしくは2個の塩基が欠失した、あるいは置換された、若しくは付加されたものも本発明の範疇に含まれる。

本発明においては、抗CD40抗体は、抗体遺伝子を発現ベクターに組み込み、ベクターを適当な宿主細胞に導入し、細胞もしくは細胞の培養上清から回収、精製することにより得ることができる。

ベクターには、宿主細胞で自律的に増殖し得るか、宿主細胞の染色体に組み込まれ得るファージ又はプラスミドが使用される。プラスミド DNAとしては、大腸菌、枯草菌又は酵母由来のプラスミドなどが挙げられ、ファージDNAとしては入

ファージ等が挙げられる。

形質転換に使用する宿主としては、目的の遺伝子を発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、細菌（大腸菌、枯草菌等）、酵母、動物細胞（COS細胞、CHO細胞等）、昆虫細胞が挙げられる。

宿主への遺伝子の導入方法は公知であり、任意の方法（例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等）が挙げられる。また、後述の動物に遺伝子を導入する方法としては、マイクロインジェクション法、ES細胞にエレクトロポレーションやリポフェクション法を使用して遺伝子を導入する方法、核移植法などが挙げられる。

本発明において、「培養物」とは、（a）培養上清、（b）培養細胞若しくは培養菌体又はその破砕物、（c）形質転換体の分泌物のいずれをも意味するものである。形質転換体を培養するには、使用する宿主に適した培地を用い、静置培養法、ローラーボトルによる培養法などが採用される。

培養後、目的タンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合には、菌体又は細胞を破砕することにより抗体を採取する。また、目的抗体が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる各種クロマトグラフィーを用いた一般的な生化学的方法を単独で又は適宜組み合わせて用いることにより、前記培養物中から目的の抗体を単離精製することができる。

さらに、トランスジェニック動物作製技術を用いて、目的抗体の遺伝子が内在性遺伝子に組み込まれた動物宿主、例えばトランスジェニックウシ、トランスジェニックヤギ、トランスジェニックヒツジ又はトランスジェニックブタを作製し、そのトランスジェニック動物から分泌されるミルク中からその抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である（Wright, G., et al. (1991) Bio/Technology 9, 830-834）。ハイブリドーマをインビトロで培養する場合には、培養する細胞種の特性、試験研究の目的及び培養方法等の種々条件に合わせて、ハイブリドーマを増殖、維持及び保存させ、培養上清中にモノクローナル抗体を産生させるために用いられるような既知栄養培地、あるいは既

知の基本培地から誘導調製されるあらゆる栄養培地を用いて実施することが可能である。

4. 抗体の性質

(1) アゴニスティック抗体の場合

本発明のアゴニスティック抗体の変異体は、アゴニスティック活性を保持しつつ、ADCC、CDC活性がオリジナルの抗体に比べ、同程度以下になっているため、免疫担当細胞を傷害することなく、免疫系を活性化することができると考えられる。そのため、オリジナル抗体に比べ同程度以上の免疫活性化作用と、同程度以下のCD40発現細胞への障害による毒性を示すことが期待される。

(2) アンタゴニスティック抗体の場合

本発明のアンタゴニスティック抗CD40抗体の変異体は、CD40Lによる免疫活性化シグナルを抑制する活性を保持しつつ、改変前の抗体に比べ、ADCC、CDC活性が低減している。また、*in vivo*においても、Fcレセプターを介すると考えられるシグナル誘導活性の低下が期待される。

5. 医薬組成物

また、本発明の抗体の精製された製剤を含有する医薬組成物もまた、本発明の範囲内に含まれる。このような医薬組成物は、好ましくは、抗体に加えて、生理学的に許容され得る希釈剤またはキャリアを含んでおり、他の抗体または抗生物質のような他の薬剤との混合物であってもよい。適切なキャリアには、生理的食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水グルコース液、および緩衝生理食塩水が含まれるが、これらに限定されるものではない。或いは、抗体は凍結乾燥（フリーズドライ）し、必要とされるときに上記のような緩衝水溶液を添加することに再構成して使用してもよい。投与経路は、経口ルート、並びに静脈内、筋肉内、皮下および腹腔内の注射または配薬を含む非経腸的ルートである。

この場合、本発明の抗体の有効量と適切な希釈剤及び薬理学的に使用し得るキャリアとの組合せとして投与される有効量は、1回につき体重1kgあたり0.0001mg～100mgであり、2日から8週間間隔で投与される。

本発明の抗体を含む医薬組成物を使用する場合は、アゴニスティック抗体については、免疫賦活化剤（抗ウィルス剤、抗感染症剤）であり、病原体としてはA、

B, C, D, またはE型肝炎ウイルス、HIV、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、EBウイルス、パピローマウイルス、クラミジア、マイコプラズマ、トキソプラズマ、マラリア、トリパノソーマ、結核などが例示される。または抗腫瘍剤であり、対象腫瘍としてはCD40を発現した癌細胞を含む悪性腫瘍、例えば膵臓癌、膀胱癌、リンパ腫（例えばホジキンリンパ腫）、白血病、悪性黒色腫、膵臓癌、肺癌、卵巣癌、膀胱癌、乳癌、大腸癌、前立腺癌、頭頸部癌が挙げられる。または自己免疫疾患治療剤であり、対象疾患としてはリウマチが例示される。または、これらの疾患が複数併発してもよい。あるいは、ガン特異的ペプチドなどのワクチンとアジュバントとして併用することもできる。また、アンタゴニスティック抗体については、臓器移植時における免疫抑制剤（膵臓移植や腎臓などの移植時における拒絶反応、GVHDの予防又は治療剤）として、あるいは自己免疫疾患（例えば、リウマチ、乾癬、潰瘍性大腸炎、クローン病、全身性エリトマトーデス、多発性硬化症、筋無力症、強皮症、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫性肝炎、特発性血小板減少性紫斑病、ベーチェット病、動脈硬化、腎炎、呼吸切迫症候群）の治療剤、喘息などアレルギーの治療剤、血液凝固第VIII因子阻害症候群の治療剤として有用であり、これらの疾患が複数併発してもよい。

6. エピトープ

優れたアゴニスト活性を有するKM341-1-19抗体および2105抗体、優れたアンタゴニスト活性を有する4D11抗体のCD40に対する結合エピトープが決定された（実施例2）。本件発明は、上記抗体とは異なる可変領域配列を有し、かつ上記抗体のいずれかと同じエピトープを認識するアゴニスティックもしくはアンタゴニスティック抗CD40抗体を提供する。このような抗体は下記の要領によって取得できる。

例えばKM341-1-19抗体と同じエピトープを認識するアゴニスティック抗CD40抗体を取得する場合、CD40をマウス等に免疫して得られたモノクローナル抗体の中から、CD40への結合に際してKM341-1-19抗体と競合するものを常法により選抜する。選抜されたものについて実施例2に記載された方法に基づき、ペプチドに対する結合パターンがKM341-1-19抗体と同じものを選抜する。

以下、実施例を以って本発明をさらに詳細に説明するが、本発明がその実施例に記載される形態のみに限定されるものではない。

実施例1 抗体、抗原蛋白質の発現精製

抗体発現細胞は、抗体の可変領域を含むベクタープラスミドを、CHO細胞(ATCC)に遺伝子導入し、G418により選択することにより安定発現株を作製した。

また、変異型抗原の発現は、ベクターを一過性にHEK細胞(ATCC)に導入することによって実施した。

上記培養上清からの抗CD40抗体の精製は以下の方法で行った。抗CD40抗体を含む培養上清をHyper D Protein A カラム(日本ガイシ製)あるいはマウスIgG1の精製にはProtein Gカラム(アマシャムファルマシアバイオテク)を用い、付属の説明書に従い吸着緩衝液としてPBS(-)、溶出緩衝液として0.1Mクエン酸ナトリウム緩衝液(pH3)を用いてアフィニティー精製した。溶出画分は1M Tris-HCl(pH8.0)あるいは Na_2HPO_4 溶液を添加してpH7.2付近に調整した。調製された抗体溶液は、透析膜(10000カット、Spectrum Laboratories社製)あるいはSPカラム(アマシャムファルマシアバイオテク)を用いてPBS(-)に置換し、孔径0.22 μm のメンブランフィルターMILLEX-GV(MILLIPORE 製)でろ過滅菌した。精製抗体の濃度は280nmの吸光度を測定し、1mg/mlを1.450Dとして算出した。

実施例2 エピトープの決定

CD40の細胞外領域の175アミノ酸(配列番号1)をカバーする、13-merペプチドを2アミノ酸ずつ、ずらして合計82種のペプチド(配列番号49から130)をCellulose膜上にC末端からスポット状に合成し、N末をアセチル化した(JERINI社:ドイツ)。以降の反応は常法のウェスタン解析(Reineke, U. ほか, (2001).

“Epitope mapping with synthetic peptides prepared by SPOT synthesis.” Antibody Engineering (Springer Lab Manual) Eds.: Kontermann/Dubel, 433-459. など参照)を元の実施した。解析はLumilImager™(Boehringer-Mannheim社)を使用し、各スポットの発色強度を数値化した(図1A-1、A-2、B-1、B-2)。

その結果、4D11抗体は20-24番目と41番目のペプチド、2105抗体は12-23番目

と64番目、KM341-1-19抗体は41、42番目のペプチド、KM643-4-11は43番目のペプチド、F72は75番目、110は64番目のペプチドを、F4-465は、34、35、54、55、65、66、75番目のペプチドを、KM281-1-10は21、24、64、75番目のペプチドを、2B11（新規抗体）は21、24、64番目のペプチドを、F76（新規抗体）は21、35、51、52番目のペプチドを強く認識することがわかった。

抗CD40抗体の結合部位を確定するため、変異を導入したCD40-FC fusion proteinを作製し結合能をELISAにより調べた。抗CD40抗体はマウスのB細胞に対して交差性を示さないため、マウスCD40のアミノ酸配列に部分的に変換した5種類のCD40Fc fusion proteinを作製し、この抗原に対する、抗体の結合を調べた。変異型CD40-FC融合蛋白質の作製方法は以下に示す。変異部位は、抗体が強く結合するペプチドの配列の部分に、マウスCD40の配列を導入することにより作製した。CD40mut1は、15番ペプチドに相当する部位のEFTEをALEKに、CD40mut2は、21番ペプチドに相当する部位のLDTをSAQへ、CD40mut3は、24番ペプチドに相当する場所のTHをIRへ、CD40mut4は、42番目ペプチドに相当する部位のEEGWをKEGQへ、CD40mut5は、64番目ペプチドに相当する部位をVSSAからQSSLへ変換した。変異体の作製は、遺伝子工学的手法に従って実施した（図2A、B、C）。解析の結果2105抗体は、CD40mut1への結合能を著しく低下させていることがわかった。また、4D11抗体、2B11は、CD40mut2への結合能を低下させていることがわかった。

実施例3 抗CD40アゴニスティック抗体のRamos細胞に対する結合活性

2×10^6 /mlの濃度でRamos細胞株を0.1%NaN₃、2%FCS含有PBSの染色バッファー（SB）に浮遊させた。細胞浮遊液（100 μ l/ウェル）を96-well 丸底プレート（ベクトンディッキンソン社製）に分注した。各々のハイブリドーマの培養上清（50 μ l）を加え、氷温下30分間インキュベートした。陰性コントロールとしてヒト血清アルブミンに対するヒトIgG1抗体を用い、ハイブリドーマ培養培地で2 μ g/mlの濃度に調製し、50 μ l添加後氷温下15分間インキュベートした。SBで洗浄した後、250倍希釈したR-PE蛍光標識抗ヒト抗体（Southern Biotechnology社製）50 μ lを加え、氷温下15分間インキュベートした。SBで2回洗浄した後、300～500 μ lのFACS緩衝液に懸濁し、FACS（FACSort、FACScan、ベクトンディッキン

ソン社製) で各細胞の蛍光強度を測定した。

実施例 4 抗CD40アゴニスティック抗体のRamos細胞に対するアゴニスティック活性評価

5. 0.5×10^5 個/ml の Ramos 細胞懸濁液を 96 ウエルプレートに $100 \mu\text{l}$ /well で播種した。ハイブリドーマ培養上清又は精製抗体を $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ に培地で希釈し、96 ウエルプレートに $100 \mu\text{l}$ /well の濃度で添加した。一晚培養後、細胞を集め R-PE 標識抗 CD95 抗体 (Pharmingen NJ) を用い、FACSCan あるいは FACSsort (ベクトンデッキンソン) を使って解析した。

実施例 5 Ramos細胞における抗CD40アンタゴニスティック抗体によるCD95発現抑制

1. 1.0×10^6 個/ml の Ramos 細胞懸濁液を 96 ウエルプレートに $50 \mu\text{l}$ /well で播種した。ハイブリドーマ培養上清又は精製抗体を $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ に培地で調整し、96 ウエルプレートに $100 \mu\text{l}$ /well 添加した。可溶性 CD40 リガンド (ALEXIS CORPORATION) を $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ と抗 FLAG 抗体 (M2、シグマ) $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ とを培地に添加し、96 ウエルプレートに $50 \mu\text{l}$ /well 添加した。一晚培養後、細胞を集め R-PE 標識抗 CD95 抗体 (Pharmingen NJ) を用い、FACS を使って解析した。

実施例 6 抗CD40抗体CDC活性の測定

CDC アッセイは、 Cr^{51} ラベルしたターゲット細胞 2000 個に対して、最終濃度 5% のヒト血清由来補体 (SIGMA 社製) もしくはウサギ血清由来補体 (CEDARLANE LABORATORIES LIMITED、オンタリオ、カナダ) を、丸底 96 ウエルプレート中で全体容量 $200 \mu\text{L}$ で、各抗体濃度とともに 37°C 、5% CO_2 存在下で 2 時間培養した。

培養後、プレートを遠心して細胞を沈めた後、上清 $50 \mu\text{L}$ を粉末シンチレーター含有の 96 穴プレート (Lumaplate™-96: パッカー社製) に移し、 55°C 、1.5 時間で乾燥した。乾燥を確認後、専用力カバー (TopSeal™-A: 96-well Microplates: パッカー社製) でプレートをカバーし、シンチレーションカウンター (トップカウント: パッカー社製) で γ 線量を測定した。

実施例 7 抗CD40抗体のADCC活性測定

抗体を介した細胞傷害性活性は、NK細胞或いは好中球などのキラー活性を有する細胞と抗体の存在下でターゲット細胞への傷害活性（抗体依存性細胞性細胞傷害活性（Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity）、以下、ADCC）、及び補体と抗体の存在下でターゲット細胞への傷害活性（補体依存性細胞傷害活性（Complement-Dependent Cytotoxicity）以下、CDC）の測定を実施した。コントロールとしてhIgGを用いた。

方法は簡単には、ターゲット細胞に放射性クロム（Cr⁵¹）を細胞質内に取り込ませ、細胞死により培養液中に遊離されるCr⁵¹量をγ線量で測定した。

具体的には、ターゲット細胞としてバーキットリンパ腫細胞株Raji（ATCC CCL-86）を10⁶個を15 μLのFetal Calf Serum（FCS）に懸濁し、50 μL（37MBq/mL）のCr⁵¹ラベルされたクロム酸ナトリウム（パーキエルマー社製：以下Cr⁵¹と書く）を添加し、1時間37℃で培養した。次に、培地を10mL添加し、遠心して培地を捨てることを3回繰り返すことで、細胞内に取り込まれていないCr⁵¹を除いた。

ADCCアッセイは、Cr⁵¹ラベルしたターゲット細胞2000個に対して、実施例6記載の方法で取得した健常人末梢血単核球200000個を、丸底96ウェルプレート（Falcon社製）中で全体容量200 μLで、各抗体濃度とともに37℃、5% CO₂存在下で4時間培養した。

培養後、プレートを遠心して細胞を沈めた後、上清50 μLを粉末シンチレーター含有の96穴プレート（Lumaplate™-96：パッカー社製）に移し、55℃、1.5時間で乾燥した。乾燥を確認後、専用力カバー（TopSeal™-A:96-well Microplates：パッカー社製）でプレートをカバーし、シンチレーションカウンター（トップカウント：パッカー社製）でγ線量を測定した。

実施例 8 抗CD40アゴニスティック抗体P331S変異体の作製と活性評価

抗CD40アゴニスティック抗体KM341-1-19および2105の遺伝子クローニングに関してはW002/099186に記載されている。IgG2定常領域の331番目ProをSerに変換す

ることによってCDC活性が低減するという報告がある。KM341-1-19抗体、2105抗体に関してもCDC活性を低減するために、P331S変異をIgG 2 定常領域に導入した。

抗体発現ベクターN5KG1-Val Lark (IDEC Pharmaceuticals:以下N5KG1と略記)の、ヒトIgG1定常領域をヒトIgG2に置き換えたもの(N5KG2)を作製し、IgG2の331番目ProをSerに変換した変異を作製した。IgG2定常領域のcDNAクローニングは、KM341-1-19ハイブリドーマを遠心によって集め、TRIZOL (Gibco BRL) を添加し、取扱説明書にしたがって、TotalRNAを抽出した。抗体cDNAの可変領域のクローニングは、CLONTECH社のSMART RACE cDNA amplification Kit を用い、添付の説明書にしたがって行った。5 μ gのtotal RNAを鋳型として、1st Strand cDNA を 作 製 し た 。 Primer の 配 列 は 、 tnIgG3Nhe : atatGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGC (配列番号2) G、tnIgG2Bam : atatggatccTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTC (配列番号3) を使い、ZtaqPCR kit (Takara) を用いて98℃ 1 秒、55℃ 30秒、72℃ 1 分 x 3 0 cycleでPCRを行い、遺伝子を増幅した。反応後、QIAGEN PCR purification kitで精製し、NheI、BamHIでdigestionし、N5KG1に組み込み配列の確認をおこなった。このベクターをN5KG2とした。

N5KG2Ser(331番目をSerに換えたもの)は、N5KG2を鋳型として、プライマーIgG3Nhe : atatGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCG (配列番号4) 、G2Ser2 : GTTTTCTCGATGGAGGCTGGGAGGCC (配列番号5) で98℃ 1 秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を15回行った。同時に、N5KG 2 を鋳型として、プライマーIgG2Bam : atatggatccTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGCTC (配列番号6) G2Ser1 : GGCCTCCCAGCCTCCATCGAGAAAAC (配列番号7) を用いて、98℃ 1 秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kit で精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃ 1 秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を5回を行い、プライマーIgG3Nhe、IgG2Bamを加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI、BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた(N5KG2Ser)。BglIII、NheIで消化した抗体可変領域の配列を含む断片をN5KG2serベクターに組み込んだ。

上述の方法で発現精製した抗体を用いて、Ramos細胞に対する結合能(図3A)、

アゴニスティック活性（図 3 B）の評価を実施した。P331Sの変異の導入によって、活性の変動は見られなかった。

実施例 9 抗CD40アゴニスティック抗体 3 3 1 ser変異体のCDC活性の測定

上述の方法によりCDC活性を測定した。ウサギ血清由来補体を使用し、Ramos細胞を標的細胞として使用した。その結果、KM341-1-19抗体は1 μ g/mlの抗体濃度ではIgG2に比べIgG2serが顕著にCDC活性が減少していることがわかった（図 4 A）。一方ヒト補体を使用した場合は、変化は見られなかった（図 4 B）。

実施例 10 アゴニスト抗CD40抗体定常領域変換体の作製と活性測定

W002/088186に記載の抗CD40抗体のうち、最も強いアゴニスティック活性を示すもの2つ（KM341-1-19抗体、2105抗体）は、IgG2サブクラスであった。IgG2サブクラスがCD40の活性化に重要であるかどうか調べるため、IgG1、IgG3、IgG4に抗体定常領域を変換した組換え蛋白質を作製し、抗原への結合能と、Ramos細胞におけるCD95発現促進活性は、実施例実施例 4、6に従って実施した。IgG1型の発現に関しては、N5KG1をIgG2、IgG3の発現に関しては、N5KG1の定常領域を、それぞれIgG2、IgG3に置きかえた発現ベクター、N5KG2、N5KG3を用いた。IgG3定常領域のcDNAクローニングはIgG2のクローニング方法を一部改変し、IgG3特異的プライマーを使用することで実施した。IgG4の発現にはN5KG4PE（IDEC Pharmaceuticals）を用いた。

抗体蛋白質の発現は、実施例1にしたがって実施した。ヒトCD40を発現しているRamos細胞への結合活性は、KM341-1-19抗体、2105抗体ともIgG2からIgG1、3、4へ変換したことによる影響は見られなかったが（図 5 A-1、図 5 A-2）、Ramos細胞におけるCD95の発現促進活性は、1/10以上低下していることがわかった（図 5 B-1、図 5 B-2）。このことは、2105抗体、KM341-1-19抗体の強いアゴニスティック活性は、抗体の結合領域を決定する可変領域の構造以外に、抗体の定常領域の構造も重要であることが示された。そこで、IgG2の定常領域内のどの領域がアゴニスティック活性に重要であるかどうか調べるために、IgG2とIgG4の構造を混ぜたdomain swap mutantを作製し、活性を測定した。以下に述べる通り、domain

swap mutantの作製においては、ヒンジ領域の置換を行うが、この場合の“ヒンジ領域”はOle H Brekke et. al. Immunology Today 1995, 16, 85-90に記載の、アッパーヒンジ (Kabat EU code 216から)、ミドルヒンジ (Kabat EU code 226から) およびロウアーヒンジ (Kabat EU code 231から) を併せたものである。domain swap mutantはKM341-1-19抗体、2105抗体のそれぞれに対して、IgG2/4 (CH1、ヒンジ領域はIgG2、それ以降はIgG4)、IgG4/2/4 (ヒンジ領域は、IgG2、それ以外はIgG4)、IgG2/4/4 (CH1はIgG2、それ以外はIgG4)、IgG4/2/2 (CH1はIgG4、それ以外はIgG2) の4種類ずつ作製した。

IgG2/4抗体発現のためのベクターN5KG2/4は、Ztaq PCR kit (Takara) を用いて作製した。N5KG2を鋳型として、プライマー IgG3Bam : atatggatccTCATTTACCCGGAGACAGGGAGAGGC (配列番号8)、24Chi4 : AGGGGTCCGGGAGATCATGAGAGTGTCTT (配列番号9) で98℃ 1秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を15回行った。同時に、N5KG4 (IDEC Pharmaceuticals) を鋳型として、プライマー 24Chi3 : AAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCT (配列番号10)、linkH2: tgatcatacgtagatatcacggc (配列番号11) を用いて、98℃ 1秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kitで精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃ 1秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を5回行い、プライマー IgG3Bam、linkH2: tgatcatacgtagatatcacggc (配列番号12) を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI、BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。

IgG4/2/4発現のためのベクターN5KG4/2/4は、N5KG4を鋳型として、linkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag (配列番号13)、G2Hin3: TTTGCGCTCAACTGTCTTGTCACCTTGGTGTGCTGGG (配列番号14)、とlinkH2: tgatcatacgtagatatcacggc (配列番号15)、G2Hin4 : ACAGTTGAGCGCAAATGTTGTGTCGAGTGCCACCG (配列番号16) を用いてそれぞれ、98℃ 1秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kitで精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、これを鋳型として98℃ 1秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を5回行い、linkH、linkH2プライマーを加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI、BamHIで切断し、N5KG1ベ

クターのIgG1定常領域と置き換えた。

IgG2/4/4発現のためのベクターN5KG2/4/4は、N5KG2を鋳型として、プライマーlinkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag (配列番号 17)、G4CH1-2:GGTGTGCTGGGCTTGTGATCTACGTTGCAG (配列番号 18) で98℃ 1秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を15回行った。同時に、N5KG4を鋳型として、プライマーG4CH1-1: CTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACC (配列番号 19)、linkH2: tgatcatagctagatatcacggc (配列番号 20) を用いて、98℃ 1秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kitで精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃ 1秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH、linkH2を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI、BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。

IgG4/2/2発現のためのベクターN5KG4/2/2は、N5KG4を鋳型として、プライマーlinkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag (配列番号 21)、G4CH1-2:GGTGTGCTGGGCTTGTGATCTACGTTGCAG (配列番号 22) で98℃ 1秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を15回行った。同時に、N5KG2を鋳型として、プライマーG4CH1-1: CTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACC (配列番号 23)、linkH2: tgatcatagctagatatcacggc (配列番号 24) を用いて、98℃ 1秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kitで精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃ 1秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH、linkH2を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI、BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。

KM341-1-19抗体、2105抗体に関してそれぞれ4種のdomain swap mutantの結合活性を調べた結果では、オリジナルのIgG2との違いは認められなかったが(図6A-1、図6A-2)、アゴニスティック活性に関しては、KM341-1-19抗体、2105抗体の両者ともIgG2/4/4のみが活性が著しく低下していた(図6B-1、図6B-2)。この結果からは、IgG2のヒンジ領域がアゴニスティック活性に重要であることが解った。

さらにヒンジ領域のなかで、どの配列が重要であるか調べた。ヒンジ領域はアッパーヒンジ、ミドルヒンジ、ロウアーヒンジの3つの部位に分けられるが

(Ole H Brekke et. al. Immunology Today 1995, 16, 85-90)、そのうちそれぞれ、IgG2に特異的は配列をIgG4のものに置換した。アッパーヒンジ (Kabat EU code 216から)、ミドルヒンジ (Kabat EU code 226から)、ロウアーヒンジ (Kabat EU code 231から) に変異を導入した抗体をIgG2UH4、IgG2MH4、IgG2LH4とし、それぞれの発現ベクターは、N5KG2UH4、N5KG2MH4、N5KG2LH4とした。なお、Kabat et. al., Sequences of proteins of immunological interest, 1991 Fifth editionに基づけば、“ヒンジ”はEUインデックス216から230と定義されている。

N5KG2UH4 は、N5KG2 を 鋳 型 と し て、 プ ラ イ マ ー linkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag (配 列 番 号 2 5)、UH4-2 : CACAACATTTggaCTCAACTcTCTTGTCACC (配列番号26) で98℃ 1秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を15回行った。同時に、N5KG2を鋳型として、プライマーUH4-1: GGTGGACAAGAgAGTTGAGtccAAATGTTGTG (配 列 番 号 2 7)、linkH2: tgatcatagctagatatcacggc (配列番号28) を用いて、98℃ 1秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kitで精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃ 1秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH、linkH2を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI、BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。

N5KG2MH4 は、N5KG2 を 鋳 型 と し て、 プ ラ イ マ ー linkH: gggtacgtcctcacattcagtgatcag (配 列 番 号 2 9)、UM4-2 : GGCACGGTGGGCAtgggggaccataTTTGCCTC (配列番号30) で98℃ 1秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を15回行った。同時に、N5KG2を鋳型として、プライマーUM4-1: GAGCGCAAAtatggtcccccaTGCCACCGTGCC (配 列 番 号 3 1)、linkH2: tgatcatagctagatatcacggc (配列番号32) を用いて、98℃ 1秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kitで精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃ 1秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH、linkH2を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI、BamHIで切断し、N5KG1ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。

N5KG2LH4 は、N5KG2 を 鋳 型 と し て、 プ ラ イ マ ー linkH:

gggtacgtccctcacattcagtgatcag (配列番号 3 3)、UL4-2 : GAAGACTGACGGTCCccccaggaactcTGGTGCTGGGCA (配列番号 3 4) で98℃ 1秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を15回行った。同時に、N5KG2を鋳型として、プライマー UL4-1 : TCCCCAGCACCAgagttcctggggGGACCGTCAGTCTTC (配列番号 3 5)、linkH2 : tgatcatacgtagatatcacggc (配列番号 3 6) を用いて、98℃ 1秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を15回行った。増幅したDNA断片をPCR purification kitで精製し、2つの精製DNA断片を等量混合したのち、98℃ 1秒、60℃ 30秒、72℃ 30秒の反応を5回行い、プライマーlinkH、linkH2を加えて、15回反応した。増幅したDNA断片をNheI、BamHIで切断し、N5KG1 ベクターのIgG1定常領域と置き換えた。

KM341-1-19抗体、2105抗体に関して、それぞれ3種類のdomain swap mutantの抗原にたいする結合活性を調べたが、同等であった(図6A-1、図6A-2)。一方 Ramos細胞に対するアゴニスティック活性に関してはIgG2UH4、IgG2MH4で著しく低下していた(図6B-1、図6B-2)。以上のことから、抗CD40抗体KM341-1-19、2105のIgG2サブクラス依存のアゴニスティック活性は、ヒンジ領域のうち、アッパーヒンジ、ミドルヒンジの構造が重要であることがわかった。

IgG2サブクラスがアゴニスティック活性に重要であることが判明したため、IgG2以外のサブクラスの抗体をIgG2サブクラスに変換してアゴニスティック活性が増強するかどうか調べた。数個のクローンについて調べたうち、F76は、IgG1からIgG2にサブクラスを変換することによって、アゴニスティック活性を増強することが出来た(図7A、B)。

実施例 1 1 抗CD40アンタゴニスト抗体変異体の作製

もともとのサブクラスはIgG1である、W002/088186に記載の4D11抗体遺伝子の重鎖、軽鎖を含むDNA断片を、BglII、NheIで消化、精製した後、N5KG4PE、N5KG4P、N5KG4ベクター (IDEC Pharmaceuticals) につなぎ換えた。N5KG4PEはIgG4定常領域に、S228P及びL235E、N5KG4PはS228Pの点変異をそれぞれ含む。抗体蛋白質の発現、精製は上述の方法によって実施した。精製抗体はRamos細胞への結合を指標に、上述の方法に従って実施した。IgG1、IgG4、IgG4P、IgG4PEのRamos細胞への結合活性の変化は見られなかった(図8A)。また上述の方法によ

ってアンタゴニスティック活性の比較を行ったが、IgG1とIgG4各種変異体との間には、アンタゴニスティック活性に関しては、差は見出されなかった（図8B）。

実施例 1 2 抗CD40アンタゴニスト抗体変異体のADCC活性、CDC活性評価

抗CD40変異抗体のADCC活性、CDC活性は、上述の方法によって実施した。

ヒトMNCをエフェクター細胞として、CD40発現Daudi細胞を標的として使用した場合、4D11抗体のものとサブクラスであるIgG1と比較して、IgG4、IgG4PEの2つの変異体はそれぞれADCC活性の著しい低下が観察された（図9）。

CDC活性に関しては、IgG1とIgG4Pの活性の比較を、Daudi細胞を標的として測定した。IgG1に比べて、IgG4PはCDC活性が顕著に低下していることがわかった（図10）。

実施例 1 3 抗CD40アンタゴニスティック抗体のB細胞に及ぼす影響

マウス内因性CD40破壊についてホモ接合体の遺伝子背景を有し、かつ、ヒトCD40遺伝子のトランスジーンを有しているマウス (Yasui, et al. Int. Immunol. 2002 Vol14 : 319) に4D11抗体のIgG1、IgG4PおよびIgG4PEをそれぞれ100 μ g尾静脈内投与した。投与24時間後に眼窩静脈叢より採血し、0.16mol/Lの塩化アンモニウムにて溶血後、FITC標識抗B220抗体を用い、FACSを用いて解析した。図11に結果を示す。図中縦軸は全リンパ球中のB細胞の割合を示す。B細胞割合の減弱の程度はIgG1>IgG4P>IgG4PEの順に大きかった。また、投与24時間後に脾臓を摘出し、スライドガラスですりつぶすことにより細胞浮遊液を調製した。細胞浮遊液を溶血後、PE標識抗B220抗体とFITC標識抗CD23、CD86またはCD95抗体を用い、FACSを用いて解析した。図12A、B、Cに結果を示す。図中縦軸は全リンパ球中の各表面マーカーを発現しているB細胞の割合を示す。4D11G1はいずれのマーカーも市販抗体であるマウス抗ヒトCD40アゴニスティック抗体5C3（ファーマンジェン）と同等の発現上昇がみられた。IgG4PEはIgG1およびIgG4Pに比して各活性化表面マーカーの発現上昇の程度は低かった。

実施例 1 4 抗CD40アンタゴニスティック抗体による抗原特異的抗体産生抑制作

用およびB細胞数の変化

マウス内因性CD40破壊についてホモ接合体の遺伝子背景を有し、かつ、ヒトCD40遺伝子のトランスジーンを有しているマウス (Yasui. et al. Int. Immunol. 2002 Vol14 : 319) に 4-hydroxy-3-nitrophenylacetyl-chiken γ -globulin conjugates (NP-CGG :大阪大学微生物病研究所 菊谷 仁教授より分与) とアラム (Alum : 水酸化アルミニウムゲル) の複合体を100 μ g (NP-CGG量として) 腹腔内注射することにより感作した。各抗体は抗原感作直前に50または100 μ gの量を尾静脈内投与した。陰性対照として抗ヒトアルブミンヒトIgG4PE抗体100 μ gを投与した。感作7および14日後、眼窩静脈叢より採血し、血清中のNP特異的IgG1およびIgM抗体量をELISA法により測定した。ELISA法はNPを結合したウシ血清アルブミン (NP-BSA : 2.5 μ g/ml) 50 μ l/ウェルを、ELISA用96穴マイクロプレート (Maxisorp, Nunc社製) の各ウェルに加え、4℃でインキュベートし、NP-BSAを吸着させた。次いで、上清を捨て、各ウェルにブロッキング試薬 (スーパーブロック、Pierce社製) を加え室温でインキュベートしブロッキングした後、各ウェルを0.1%Tween20含有リン酸緩衝液 (PBS-T) で3回洗浄した。次いで、各ウェルに10%ブロックエース含有PBS-Tで希釈した各血清 (50 μ l/ウェル) を加え、37℃で2時間インキュベートし反応させた。マイクロプレートをPBS-Tで3回洗浄後、アルカリフォスファターゼで標識されたヤギ抗マウスIgG1抗体またはIgM抗体 (コスモバイオ、1070-04または1020-04) を10%ブロックエース含有PBS-Tで1,000倍に希釈した溶液 (50 μ g/ウェル) を、各ウェルに加え、37℃で2時間インキュベートした。次いで、マイクロプレートをPBS-Tで3回洗浄後、発色基質液 (50 μ l/ウェル、Sigma104、phosphatase substrate) を各ウェルに加え、波長405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。その結果を図13 A、Bに示す。図中縦軸はNP-CGGをC57BL/6マウスに2回注射した後採血してプールした血清について、IgG1の場合は10,000倍希釈したものを、IgM抗体の場合は100倍したものをそれぞれ1ユニットとして換算した値を示す。4D11抗体および281のIgG4PまたはIgG4PE抗体はNP特異的なIgG1およびIgM抗体産生を同等に強く抑制した。

抗体産生抑制作用の検討に用いたマウスの末梢血中および脾臓中のB細胞数の

変化を実施例1と同様の方法で測定した。その結果を図14A、Bに示す。4D11および281のIgG4P抗体はIgG4PE抗体に比して末梢血中B細胞割合の減少がより顕著であった。また、抗原感作14日後に摘出した脾臓中B細胞の割合についてもIgG4PE抗体100 μ gの投与では変化がみられなかったのに対し、IgG4Pの投与では減少または減少傾向がみられた。

実施例15 抗CD40アンタゴニスティック抗体のカニクイザルにおける作用

4D11抗体のIgG4PまたはIgG4PEの30mg/kgをカニクイザルの前腕橈側皮静脈内に投与し、一定時間後に大腿静脈より採血した。末梢血リンパ球サブセット解析は各細胞浮遊液をFITC標識抗CD3抗体、PE標識抗CD20抗体およびAPC標識抗CD45抗体を用い、FACSを用いて陽性細胞比率の計測を行い、CD45陽性細胞における比率を算出した。その結果を図15に示す。図中縦軸は抗体投与前のCD20陽性細胞比率に対する各時間でのCD20陽性細胞比率の割合を示す。IgG4P抗体投与個体では抗体投与1～7日後の間にCD20陽性細胞は約40%減少したが、IgG4PE抗体投与個体では4日後に約20%減少するのみであった。

血清中のIL12濃度はELISA法にて測定した。大腿静脈より採取した血液を室温で20～60分間静置後、室温で3000rpm、15分間遠心分離して得られた血清をmonkey IL12 ELISA kit (Biosource社)を用いて測定した。その結果を図16に示す。IgG4PE抗体はいずれの採血ポイントにおいてもIL12の産生増加は認められなかったが、IgG4P抗体は4日目をピークにIL12産生がみられた。

実施例16 抗CD40アンタゴニスティック抗体のカニクイザル遅延型過敏症モデルにおける作用

テタヌス毒素 (Tetanus toxoid: TTx) (10Lf/ml; デンカ生研株式会社) を雄カニクイザル9匹に皮内及び筋肉内に感作し、TTxに対する遅延型過敏症を誘発させるとともに、感作開始の10分前に0.1及び10mg/kg 4D11G4PE抗体の静脈内投与を各3匹に3回(1週間毎に1回)実施し、4D11G4PEの遅延型過敏症に対する作用を検討した。ケタミンの筋肉内投与による麻酔下で、感作は背部皮内(50 μ L/site \times 12部位)及び大腿部筋肉内(0.6mL/body)に、惹起は感作の21日後に胸

部皮内 ($10\mu\text{L}/\text{site}$ 、3ヵ所ずつ： $0\sim 10\text{Lf}/\text{ml}$) にTTxを投与した。惹起後24及び48時間に投与部位の皮膚反応を観察し、Draizeの皮膚障害判定基準に従い評価した。なお、TTx各濃度3ヵ所における結果は、それぞれを平均したものをを用いた。その結果を図17に示す。4D11G4PE抗体の投与により、24及び48時間後にみられる遅延型過敏症反応は明らかに抑制された。

TTx 特異的IgGおよびIgM抗体価に及ぼす影響を検討した。経時的に大腿静脈より採取した血液を室温で20～60分間静置後、室温で3000rpm、15分間遠心分離して得られた血清中の抗体価をELISA法を用いて測定した。ELISA法はTTx ($0.5\text{Lf}/\text{ml}$) $100\mu\text{l}$ /ウェルを、ELISA用96穴マイクロプレート (Maxisorp, Nunc 社製) の各ウェルに加え、 4°C で一晩インキュベートし、TTxを吸着させた。次いで、上清を捨て、各ウェルにブロッキング試薬 (0.5% BSA含有リン酸緩衝液) を加え室温でインキュベートしブロッキングした後、各ウェルを 0.05% Tween20含有リン酸緩衝液 (PBS-T) で3回洗浄した。次いで、各ウェルに 0.5% BSA含有PBS-Tで希釈した各血清 ($100\sim 819200$ 倍希釈、希釈倍率=2； $100\mu\text{l}$ /ウェル) を加え、室温で2時間インキュベートし反応させた。マイクロプレートをPBS-Tで3回洗浄後、ペルオキシダーゼで標識されたヤギ抗サルIgG抗体またはIgM抗体 (Nordic Immunology) を 0.5% BSA含有PBS-Tで3,000倍に希釈した溶液 ($100\mu\text{g}/\text{ウェル}$) を、各ウェルに加え、室温で1時間インキュベートした。次いで、マイクロプレートをPBS-Tで3回洗浄後、発色基質液 ($100\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 、0-フェニレンジアミン塩酸塩+過酸化水素水) を各ウェルに加え、波長492nmでの吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。抗TTx抗体価は吸光度が0.1以上となる最大希釈倍率とし、100倍希釈においても吸光度が0.1に達しない場合は0とした。その結果を図18及び19に示す。4D11G4PE $1\text{mg}/\text{kg}$ の投与により、TTx特異的IgGおよびIgM抗体価は約1/10に抑制された。また、 $10\text{mg}/\text{kg}$ の投与ではいずれの採血ポイントでも抗体価は検出感度以下であった。

実施例17 抗CD40アンタゴニスティック抗体の血小板血栓形成に与える影響

正常ヒトより採取した血液を4等分し (各6ml)、それぞれ $100\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度となるようにコントロールヒトIgG4PE, コントロールマウスIgG2a, ヒト抗ヒト

CD40 IgG4PE (4D11)、マウス抗ヒトCD154 IgG2a (5C8) を加え37℃で10分間インキュベートした。Flat perfusion chamber (Glycotech社) およびコラーゲンコートペトリデッシュを付属の説明書に従い組み立て、そのチャンバーに各種抗体で処理した血液を1500/sのずり応力が加わる速度で7分間流した。その後4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液を同じく1500/sのずり応力が加わる速度で10分間流し、ペトリデッシュ上に形成された血小板凝集塊を固定し、さらに血小板特異的PE標識抗CD41a抗体で染色したうえ蛍光顕微鏡で観察した。その結果を図20A、Bに示す。ヒト抗ヒトCD40 IgG4PE (4D11) で処理した血液は、コントロール抗体で処理した血液と同様に、コラーゲンコートペトリデッシュ上に血小板凝集塊を形成したが、マウス抗ヒトCD154 IgG2aで処理した血液は血小板凝集塊を形成しなかった。

実施例18 抗CD40アンタゴニスティック抗体の安定性の評価

4D11抗体の定常領域改変抗体の安定性を比較検討した。方法としてはG4P、G4PE、G2SerおよびG4/2/4をHEK293細胞で一過性発現することにより得られた培養上清をProtein Aカラム (アマシャムバイオサイエンス社) にチャージし0.1Mクエン酸バッファー (pH2.7) により溶出した後37℃で1分間および10分間インキュベートした。その後50mMリン酸バッファー (pH7.0) により中和した。得られた抗体溶液のオリゴマー含有率をゲルろ過カラム (東ソー社) を用いて測定した。その結果インキュベート時間に応じてオリゴマー含有率が増加し、G4/2/4>G4PE>G2Ser>G4Pの順にオリゴマーが生成しやすいことが判明した (図21)。

実施例19 抗CD40アンタゴニスティック抗体による皮膚移植片拒絶抑制作用

マウス内因性CD40破壊についてホモ接合体の遺伝子背景を有し、かつ、ヒトCD40遺伝子のトランスジーンを有しているC57BL/6背景マウス側胸背部にDBA/2マウス尾部より採取した移植片を植え込み絆創膏で7日間固定した。被験物質4D11G4PE 100 μ gまたはvehicleは皮膚移植当日から0、2、4、7、9、11、14日後にそれぞれ尾静脈内投与した。NK細胞による移植片拒絶を抑えるため、手術の3日前及び術後1、4、9日後にそれぞれ抗アシアロGM1抗体100 μ gを全頭に腹腔内投

与した。図 2 2 に結果を示す。4D11G4PE投与群において、vehicle投与群と比較して有意な移植片拒絶遅延が観察された。

実施例 2 0 ヒト腫瘍細胞株におけるCD40の発現解析

パーキットリンフォーマ細胞株Ramos、膀胱癌細胞株T24 (ATCC、HTB-4)、膵臓癌細胞株Hs 766T (ATCC、HTB-134) およびCapan-2 (ATCC、HTB-80) におけるCD40の発現は、341G2Serを用いたFACS解析により確認した。

各細胞株をT24、Hs 766T、Capan-2についてはトリプシン消化後、Ramosについてはそのまま回収し、PBSで洗浄後、341G2Ser 1 μ g/mlを含む染色用緩衝液に再懸濁した。染色用バッファーは、PBSに0.5mM EDTA、0.05%アジ化ナトリウム、5%非動物化済みウシ血清を添加して作成した。4℃で15分間インキュベーション後、細胞を染色用バッファーで2回洗浄し、PE結合ヤギ抗ヒトIgG (γ) (Southern Biotechnology Associates, Inc) を染色用バッファーで1:250に希釈した溶液に再懸濁した。4℃で15分間インキュベーション後、細胞を染色用バッファーで2回洗浄し、FACSCalibur (BDバイオサイエンス社製) で分析した。陰性コントロールには、等量のヒト抗2,4ジニトロフェノール (DNP) 抗体を用いた。データ解析ソフトはCellquest (BDバイオサイエンス社製) で行い、平均蛍光強度を算出した。

その結果、Ramos、T24、Hs 766T、Capan-2では、341G2Serで染色した場合の平均蛍光強度が陰性コントロールと比較して明らかに高く、CD40の発現が確認された。

実施例 2 1 ヒト腫瘍細胞株に対する抗CD40アゴニスティック抗体の効果

Ramosは 2.5×10^3 個、T24は 2.5×10^2 個、Hs 766TおよびCapan-2は 5×10^3 個を培地に懸濁し、平底96ウェルプレート (FALCON社製) 中で全体容量100 μ Lで、341G2Ser 1 ng/ml~1000ng/mlの濃度とともに37℃、5%CO₂存在下で、RamosおよびHs 766Tは66時間、Capan-2は90時間、T24は114時間培養した。10 μ L (3.7MBq/mL) の³Hラベルされたチミジン (アマシャムバイオサイエンス社製) を添加し、37℃、5%CO₂存在下で6時間培養した。Ramosは、96Micro cell

harvester (SKATRON社製) を用いて、Printed Filtermat A (パーキンエルマー社製) に細胞を回収し、サンプルバッグ (パーキンエルマー社製) でカバーし、ベータプレートシンチ (パーキンエルマー社製) 12mLを添加し、液体シンチレーションカウンター (ファルマシア1205ベータプレート: ファルマシア社製) で β 線量を測定した。Hs 766T、T24およびCapan-2は、ハーベスター (パーキンエルマー社製) を用いてユニフィルター (パーキンエルマー社製) に細胞を回収し、裏に専用のシールを貼り、マイクロシンチ20 (パーキンエルマー社製) を20 μ L/well添加し、シンチレーションカウンター (トップカウント: パーカー社製) で β 線量を測定した。データは、3つの独立した実験で得られた3重反復測定値の平均を、非処理対照の値で除して細胞生存率(%)として表した。

その結果、全ての細胞株で341G2Serの濃度依存的に細胞生存率が低下した (表1)。341G2Ser 100ng/ml添加時の細胞生存率は、Ramosにおいては58%、T24においては22%、Hs 766Tにおいては15%、Capan-2においては77%であり、341G2SerがRamos、T24、Hs 766TおよびCapan-2の細胞増殖を抑制する活性をもつことが明らかとなった。

表 1

細胞株	細胞の 生存率			
	341G2Ser 濃度 (ng/ml)			
	1	10	100	1000
Ramos	98.49%	81.68%	57.77%	55.26%
T24	97.94%	50.72%	21.97%	25.35%
Hs 766T	34.67%	21.50%	14.67%	15.18%
Capan-2	100.94%	85.34%	76.76%	72.89%

実施例 2 2 マウス担癌モデルに対する抗CD40アゴニスティック抗体の効果

(1) Ramos細胞

6週齢の雌性Balb/cヌードマウス (日本クレア (株) 社より購入) に、3Gyの放射線を照射し、背部皮下にRamosを 2×10^7 個/マウス個体で移植した。移植16日後に、生着した腫瘍の大きさを測定し、腫瘍の大きさが50~170mm³の担癌マウスを5匹1群として群分けした。担癌マウスの静脈内に、341G2Ser 100 μ g/マウス個

体（200 μ lの1%ヌードマウス血清を含むPBSに溶解したもの）を16日目に1回投与し、47日目まで腫瘍大きさを測定した。陰性コントロールとしてヒト抗ヒト血清アルブミン（HAS）抗体を使用した。

（2）T24細胞

ヌードマウス背部皮下にて継代を3回繰り返したT24細胞塊を摘出し、6週齢の雌性Balb/cヌードマウス（日本クレア（株）社より購入）の背部皮下に移植した。移植する腫瘍細胞塊は3mm四方形度が適当である。移植10日後に、生着した腫瘍の大きさを測定し、腫瘍の大きさが80～200mm³の担癌マウスを5匹1群として群分けした。担癌マウスの静脈内に、341G2Ser 100 μ g/マウス個体（200 μ lの1%ヌードマウス血清を含むPBSに溶解したもの）を10日目に1回投与し、29日目まで腫瘍大きさを測定した。陰性コントロールとして、等量のヒト抗DNP抗体を使用した。

（3）Hs 766T細胞

8週齢の雌性Balb/cヌードマウス（日本クレア（株）社より購入）の背部皮下に、Hs 766T 7 \times 10⁶個/マウス個体で移植した。移植16日後に、生着した腫瘍の大きさを測定し、腫瘍の大きさが50～140mm³の担癌マウスを5匹1群として群分けした。担癌マウスの静脈内に、341G2Ser 100 μ g/マウス個体（200 μ lの1%ヌードマウス血清を含むPBSに溶解したもの）を16日目に1回投与し、32日目まで腫瘍大きさを測定した。陰性コントロールとして、等量のヒト抗DNP抗体を使用した。

（4）Capan-2細胞

6週齢の雌性Balb/cヌードマウス（日本クレア（株）社より購入）の背部皮下に、Capan-2 2 \times 10⁶個/マウス個体で移植した。移植13日後に、生着した腫瘍の大きさを測定し、腫瘍の大きさが30～130mm³の担癌マウスを5匹1群として群分けした。担癌マウスの静脈内に、341G2Ser 10または100 μ g/マウス個体（200 μ lの1%ヌードマウス血清を含むPBSに溶解したもの）を13日目から週2回投与し、34日目まで腫瘍大きさを測定した。陰性コントロールとして、ヒトポリクローナル抗体（hIgG）（シグマ社製）を使用した。

腫瘍増殖抑制率（TGIR）は以下の式で計算した。

100- [(341G2Ser投与群の最終測定日の平均腫瘍体積 - 341G2Ser投与群の抗体投与開始日の平均腫瘍体積) / (陰性コントロール投与群の最終測定日の平均腫瘍体積 - 陰性コントロール投与群の抗体投与開始日の平均腫瘍体積)] × 100]

その結果、T24、Hs766TおよびCapan-2担癌マウスではTGIRが100%を超え、腫瘍体積の退縮が観察された。一方、Ramos担癌マウスでもTGIR 73.4%であり、腫瘍体積の増大が大幅に抑制された(表2)。図23から26にそれぞれ、Ramos細胞、T24細胞、Hs 766T細胞およびCapan-2細胞を移植した担癌マウスに341G2Serを投与した場合の細胞移植後の腫瘍体積の変化を示す。

表 2

腫瘍増殖 抑制率	341G2Ser 投与量	
	10 μ g/head	100 μ g/head
Ramos	-	73.40%
T24	-	109.05%
Hs 766T	-	108.55%
Capan-2	103.49%	119.20%

抑制率は、各細胞株とも測定最終日における値を示す。

産業上の利用可能性

実施例に示すように、定常領域に変異を導入した本発明の抗CD40抗体およびサブクラスの一部の構造を他のサブクラスのものに置換した抗CD40抗体は、その活性を保持しつつ、ADCC活性およびCDC活性が低減されている。従って、本発明の抗体を治療用抗体として被験体に投与した場合、CD40発現細胞に対する細胞障害活性が弱く、安全に用いることができる。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

配列表フリーテキスト

配列番号 2 から 3 6 : 合成DNA

配列番号 4 9 から 1 3 0 : 合成ペプチド

請求の範囲

1. ヒトIgG2のアップーヒンジおよびミドルヒンジを有し、定常領域にADCCおよび/またはCDCの増加または低減を生じせしめる1以上のアミノ酸の欠失または置換もしくは1以上のアミノ酸が付加されたアゴニスト活性を有するCD40に結合するモノクローナル抗体の重鎖。

2. 定常領域がヒトIgGである、請求項1に記載の重鎖。

3. ヒトIgGがヒトIgG1である、請求項2に記載の重鎖。

4. ヒトIgGがヒトIgG2である、請求項2に記載の重鎖。

5. ヒトIgGがヒトIgG3である、請求項2に記載の重鎖。

6. ヒトIgGがヒトIgG4である、請求項2に記載の重鎖。

7. 定常領域のアミノ酸の置換が、KabatらによるEUインデックスにより示される331位のプロリンのセリンへの置換である、請求項3～5のいずれか1項に記載の重鎖。

8. 請求項1～7のいずれか1項に記載の重鎖を含むモノクローナル抗体。

9. ハイブリドーマKM341-1-19（受託番号FERM BP-7759）が産生するモノクローナル抗体の重鎖の可変領域を有する、請求項1～7のいずれか1項に記載の重鎖。

10. 請求項9に記載の重鎖およびハイブリドーマKM341-1-19（受託番号FERM BP-7759）が産生するモノクローナル抗体の軽鎖の可変領域を有する軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

11. 配列番号38で表されるポリペプチドの可変領域を有する、請求項1～7のいずれか1項に記載の重鎖。

12. 請求項11に記載の重鎖および配列番号40で表されるポリペプチドの可変領域を有するモノクローナル抗体の軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

13. 配列番号132で表されるポリペプチドからシグナル配列を除いた部分からなる請求項1に記載の重鎖。

14. 請求項13に記載の重鎖および配列番号134で表されるポリペプチドからシグナル配列を除いた部分からなるモノクローナル抗体の軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

ノモノクローナル抗体。

15. 配列番号131で表されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主から産生される請求項1に記載の重鎖。

16. 配列番号131で表されるポリヌクレオチドおよび配列番号133で表されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主から産生される請求項8に記載のモノクローナル抗体。

17. ハイブリドーマ2105（受託番号FERM BP-8024）が産生するモノクローナル抗体の重鎖の可変領域を有する、請求項1～7のいずれか1項に記載の重鎖。

18. 請求項17に記載の重鎖およびハイブリドーマ2105（受託番号FERM BP-8024）が産生するモノクローナル抗体の軽鎖の可変領域を有する軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

19. 配列番号42で表されるポリペプチドの可変領域を有する、請求項1～7のいずれか1項に記載の重鎖。

20. 請求項19に記載の重鎖および配列番号44で表されるポリペプチドの可変領域を有するモノクローナル抗体の軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

21. 配列番号136で表されるポリペプチドからシグナル配列を除いた部分からなる請求項1に記載の重鎖。

22. 請求項21に記載の重鎖および配列番号138で表されるポリペプチドからシグナル配列を除いた部分からなるモノクローナル抗体の軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

23. 配列番号135で表されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主から産生される請求項1に記載の重鎖。

24. 配列番号135で表されるポリヌクレオチドおよび配列番号137で表されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主から産生される請求項8に記載のモノクローナル抗体。

25. 配列番号131で表されるポリヌクレオチド。

26. 配列番号133で表されるポリヌクレオチド。

27. 請求項25に記載のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。

28. 請求項26に記載のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。

29. 請求項25および26に記載のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。
30. 請求項27に記載の発現ベクターを含む宿主。
31. 請求項28に記載の発現ベクターを含む宿主。
32. 請求項29に記載の発現ベクターを含む宿主。
33. 請求項30に記載の宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主からモノクローナル抗体の重鎖を取得する工程を含む、モノクローナル抗体の重鎖を製造する方法。
34. 請求項32に記載の宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主からモノクローナル抗体を取得する工程を含む、モノクローナル抗体を製造する方法。
35. 配列番号135で表されるポリヌクレオチド。
36. 配列番号137で表されるポリヌクレオチド。
37. 請求項35に記載のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。
38. 請求項36に記載のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。
39. 請求項35および36に記載のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。
40. 請求項37に記載の発現ベクターを含む宿主。
41. 請求項38に記載の発現ベクターを含む宿主。
42. 請求項39に記載の発現ベクターを含む宿主。
43. 請求項40に記載の宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主からモノクローナル抗体の重鎖を取得する工程を含む、モノクローナル抗体の重鎖を製造する方法。
44. 請求項42に記載の宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主からモノクローナル抗体を取得する工程を含む、モノクローナル抗体を製造する方法。
45. ヒトIgG2のアップパーヒンジおよびミドルヒンジを有していない抗体のアップパーヒンジおよびミドルヒンジを、ヒトIgG2のアップパーヒンジおよびミドルヒンジに置換する工程を含む、アゴニスト活性を有するCD40に結合するモノクロ

ーナル抗体の重鎖の製造方法。

46. CD40に結合するモノクローナル抗体の重鎖の可変領域のポリペプチドを特定する工程を含む、該可変領域とヒトIgG2のアッパーヒンジおよびミドルヒンジを有するモノクローナル抗体の重鎖の製造方法。

47. ヒトIgG2のアッパーヒンジおよびミドルヒンジを有していない抗体のアッパーヒンジおよびミドルヒンジを、ヒトIgG2のアッパーヒンジおよびミドルヒンジに置換する工程を含む、アゴニスト活性を有するCD40に結合するモノクローナル抗体の製造方法。

48. CD40に結合するモノクローナル抗体の重鎖の可変領域のポリペプチドを特定する工程を含む、該可変領域とヒトIgG2のアッパーヒンジおよびミドルヒンジを有するモノクローナル抗体の製造方法。

49. 請求項8、10、12、14、16、18、20、22および24のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体を有効成分として含む医薬組成物。

50. 悪性腫瘍、病原体または自己免疫疾患の予防または治療に用いられる、請求項49に記載の医薬組成物。

51. 請求項49に記載の医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む、悪性腫瘍、病原体または自己免疫疾患を予防または治療する方法。

52. 悪性腫瘍、病原体または自己免疫疾患の予防または治療に用いられる医薬組成物を製造するための、請求項8、10、12、14、16、18、20、22および24のいずれか1項に記載のモノクローナル抗体の使用。

53. 定常領域にADCCおよび/またはCDCの増加または低減を生じせしめる1以上のアミノ酸の欠失または置換もしくは1以上のアミノ酸が付加されたアンタゴニスト活性を有するCD40に結合するモノクローナル抗体の重鎖。

54. 定常領域がヒトIgGである、請求項53に記載の重鎖。

55. ヒトIgGがヒトIgG1である、請求項54に記載の重鎖。

56. ヒトIgGがヒトIgG2である、請求項54に記載の重鎖。

57. ヒトIgGがヒトIgG3である、請求項54に記載の重鎖。

58. ヒトIgGがヒトIgG4である、請求項54に記載の重鎖。

59. 定常領域のアミノ酸の置換が、KabatらによるEUインデックスにより

示される235位のロイシンからグルタミン酸への置換である、請求項55、57および58のいずれか1項に記載の重鎖。

60. 定常領域に、重鎖どうしのSS結合形成を促進させる1以上のアミノ酸の欠失または置換もしくは1以上のアミノ酸が付加されている、請求項53～59のいずれか1項に記載の重鎖。

61. 定常領域のアミノ酸の置換が、KabatらによるEUインデックスにより示される228位のセリンからプロリンへの置換である、請求項60記載の抗体の重鎖。

62. 請求項53～61のいずれか1項に記載の重鎖を含むモノクローナル抗体。

63. ハイブリドーマ4D11（受託番号FERM BP-7758）が産生するモノクローナル抗体の重鎖の可変領域を有する、請求項53～61のいずれか1項に記載の重鎖。

64. 請求項63に記載の重鎖およびハイブリドーマ4D11（受託番号FERM BP-7758）が産生するモノクローナル抗体の軽鎖の可変領域を有する軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

65. 配列番号46で表されるポリペプチドの可変領域を有する、請求項53～61のいずれか1項に記載の重鎖。

66. 請求項65に記載の重鎖および配列番号48で表されるポリペプチドの可変領域を有するモノクローナル抗体の軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

67. 配列番号140で表されるポリペプチドからシグナル配列を除いた部分からなる請求項53に記載の重鎖。

68. 請求項67に記載の重鎖および配列番号142で表されるポリペプチドからシグナル配列を除いた部分からなるモノクローナル抗体の軽鎖、からなるモノクローナル抗体。

69. 配列番号139で表されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主から産生される請求項53に記載の重鎖。

70. 配列番号139で表されるポリヌクレオチドおよび配列番号141で表されるポリヌクレオチドを有する発現ベクターを含む宿主から産生される請求項62

に記載のモノクローナル抗体。

- 7 1. 配列番号139で表されるポリヌクレオチド。
- 7 2. 配列番号141で表されるポリヌクレオチド。
- 7 3. 請求項 7 1 に記載のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。
- 7 4. 請求項 7 2 に記載のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。
- 7 5. 請求項 7 1 および 7 2 に記載のポリヌクレオチドを有する発現ベクター。
- 7 6. 請求項 7 3 に記載の発現ベクターを含む宿主。
- 7 7. 請求項 7 4 に記載の発現ベクターを含む宿主。
- 7 8. 請求項 7 5 に記載の発現ベクターを含む宿主。
- 7 9. 請求項 7 6 に記載の宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主からモノクローナル抗体の重鎖を取得する工程を含む、モノクローナル抗体の重鎖を製造する方法。
- 8 0. 請求項 7 8 に記載の宿主を培養液中で培養し、該培養物及び/または該宿主からモノクローナル抗体を取得する工程を含む、モノクローナル抗体を製造する方法。
- 8 1. 請求項 6 2、6 4、6 6、6 8 および 7 0 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体を有効成分として含む医薬組成物。
- 8 2. 移植拒絶、自己免疫疾患、アレルギーまたは血液凝固第Ⅷ因子阻害症候群の予防または治療に用いられる、請求項 8 1 に記載の医薬組成物。
- 8 3. 請求項 8 1 に記載の医薬組成物を哺乳動物に投与することを含む、移植拒絶、自己免疫疾患、アレルギーまたは血液凝固第Ⅷ因子阻害症候群を予防または治療する方法。
- 8 4. 移植拒絶、自己免疫疾患、アレルギーまたは血液凝固第Ⅷ因子阻害症候群の予防または治療に用いられる医薬組成物を製造するための、請求項 6 2、6 4、6 6、6 8 および 7 0 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体の使用。
- 8 5. ヒト抗体の重鎖定常領域に 1 以上のアミノ酸の欠失または置換もしくは 1 以上のアミノ酸を付加する工程を含む、アゴニスティック活性が低減されたアンタゴニスト活性を有する CD40 に結合するモノクローナル抗体の重鎖の製造方

法。

86. 定常領域がヒトIgGである、請求項85に記載の方法。

87. ヒトIgGがヒトIgG4である、請求項86に記載の方法。

88. 定常領域のアミノ酸の置換が、KabatらによるEUインデックスにより示される235位のロイシンからグルタミン酸への置換である、請求項85～87のいずれか1項に記載の方法。

89. 配列番号131で表されるポリヌクレオチドからシグナル配列をコードする部分を除いた、ポリヌクレオチド。

90. 配列番号133で表されるポリヌクレオチドからシグナル配列をコードする部分を除いた、ポリヌクレオチド。

91. 配列番号135で表されるポリヌクレオチドからシグナル配列をコードする部分を除いた、ポリヌクレオチド。

92. 配列番号137で表されるポリヌクレオチドからシグナル配列をコードする部分を除いた、ポリヌクレオチド。

93. 配列番号139で表されるポリヌクレオチドからシグナル配列をコードする部分を除いた、ポリヌクレオチド。

94. 配列番号141で表されるポリヌクレオチドからシグナル配列をコードする部分を除いた、ポリヌクレオチド。

図 1 A-1

配列	2105	KM643-4-11	F2-103	110	KM341-1-19
1. EPPTACREKQYLI	16353	13220	31427	13403	14108
2. PTACREKQYLINS	17358	13220	39202	13575	14194
3. ACREKQYLINSQC	20267	13212	35911	13681	14013
4. REKQYLINSQCCS	17096	13305	43762	13685	13952
5. KQYLINSQCCSLC	23249	13292	36839	13894	13779
6. YLINSQCCSLCQP	16140	13470	44975	13964	13909
7. INSQCCSLCQPGQ	15918	13390	54811	13652	13751
8. SQCCSLCQPGQKL	18804	13271	60441	13872	13819
9. CCSLCQPGQKLVS	16534	13436	56601	13821	13851
10. SLCQPGQKLVSDC	18155	13314	54718	13705	13965
11. CQPGQKLVSDCTE	17614	13460	52073	13699	13781
12. PGQKLVSDCTEFT	91270	13334	58177	13464	13725
13. QKLVSDCTEFTET	96926	13465	49003	14916	13875
14. LVSDCTEFTETEC	141877	13634	62580	13394	13783
15. SDCTEFTETECPL	148692	13213	42916	13571	13696
16. CTEFTETECPLCG	145926	13591	38170	13220	13824
17. EFTETECPLCGES	136350	13593	56597	13434	13638
18. TETECPLCGESEF	77805	13298	33201	13398	13723
19. TECLPCGESEFLD	50648	13544	29781	13488	13685
20. CLPCGESEFLDTW	79246	13736	26075	13599	13807
21. PCGESEFLDTWNR	93482	13626	44337	16142	13830
22. GESEFLDTWNRET	68932	14815	45811	13777	13832
23. SEFLDTWNRETHC	105899	13777	40462	14023	13898
24. FLDTWNRETHCHQ	55803	15498	79990	40210	13937
25. DTWNRETHCHQHK	19237	13367	34525	13995	13737
26. WNRETHCHQHKEYC	22963	13843	32912	15601	13595
27. RETHCHQHKEYCDP	16522	13282	41600	13644	13595
28. THCHQHKEYCDPNL	25181	13211	32264	13567	13621
29. CHQHKEYCDPNLGL	16455	13300	34480	13684	13671
30. QHKEYCDPNLGLRV	16627	13541	39057	13461	13670
31. KYCDPNLGLRVQQ	16429	13491	46485	13452	13779
32. CDPNLGLRVQQKG	16877	13454	90926	13293	13799
33. PNLGLRVQQKGTS	18117	13611	123330	13358	13917
34. LGLRVQQKGTSSET	22898	13512	237353	13381	15032
35. LRVQQKGTSSETDT	24787	13599	250401	13364	13774
36. VQQKGTSSETDTIC	28492	13372	35303	13124	13686
37. QKGTSSETDTICTC	27724	13490	35334	13298	13569
38. GTSETDTICTCEE	18834	13340	29905	13289	13525
39. SETDTICTCEEGW	16914	13340	24871	13315	13486
40. TDTICTCEEGWHC	17866	13568	24475	13481	13631

図 1 A-2

配列	2105	KM643-4-11	F2-103	110	KM341-1-19
41. TICTCEEGWHCTS	18122	13767	24169	13564	68670
42. CTCEEGWHCTSEA	17485	18955	28190	13736	75214
43. CEEGWHCTSEACE	16859	41843	32056	13525	16033
44. EGWHCTSEACESC	17735	13381	35518	13771	13867
45. WHCTSEACESCVL	64890	13444	38190	13708	13687
46. CTSEACESCVLHR	16788	13446	39497	13859	13636
47. SEACESCVLHRSC	16421	13555	40206	13482	13584
48. ACESCVLHRSCSP	15795	13183	36735	13503	13575
49. ESCVLHRSCSPGF	47038	13504	41251	14500	13637
50. CVLHRSCSPGFGV	17469	13279	45795	13484	13573
51. LHRSCSPGFGVKQ	16635	13382	88644	13187	13567
52. RSCSPGFGVKQIA	16642	13339	114128	13368	13623
53. CSPGFGVKQIATG	17457	13485	110624	13323	13703
54. PGFGVKQIATGVS	18818	13577	253876	13234	13769
55. FGFKQIATGVSDT	20521	13429	697242	13178	13903
56. VKQIATGVSDTIC	20855	13510	91544	13176	13681
57. QIATGVSDTICEP	19014	13523	40193	13154	13575
58. ATGVSDTICEPCP	17139	13526	38012	13127	13599
59. GVSDTICEPCPVG	16515	13508	31118	13376	13571
60. SDTICEPCPVGFF	42762	13590	25542	13392	13534
61. TICEPCPVGFFSN	25039	13366	27921	13524	13783
62. CEPCPVGFFSNVS	18141	13429	31377	14364	13717
63. PCPVGFFSNVSSA	20806	13343	51411	19243	13979
64. PVGFFSNVSSAFE	95541	14553	128669	158203	14523
65. GFFSNVSSAFEKC	67908	13506	94016	14323	13831
66. FSNVSSAFEKCHP	22379	13350	124184	14057	13699
67. NVSSAFEKCHPWT	18703	13298	44966	13518	13676
68. SSAFEKCHPWTSC	19809	13459	37784	13433	13553
69. AFEKCHPWTSCET	16212	13387	38013	13279	13683
70. EKCHPWTSCETKD	15198	13423	39248	13315	13494
71. CHPWTSCETKDLV	15754	13383	40627	13228	13673
72. PWTSCETKDLVVQ	15609	13426	46662	13247	13613
73. TSCETKDLVVQQA	16454	13377	46750	13228	13670
74. CETKDLVVQQAGT	16875	13544	42504	13185	13700
75. TKDLVVQQAGTNK	17357	14026	83860	13184	13674
76. DLVVQQAGTNKTD	17735	13434	34853	13154	13776
77. VVQQAGTNKTDVV	17176	13805	51573	13166	13651
78. QQAGTNKTDVVC	15794	13261	27337	13103	13398
79. AGTNKTDVVCQPQ	15793	13448	25989	13304	13658
80. TNKTDVVCQPQDR	15114	13481	24807	13199	13767
81. KTDVVCQPQDRLR	15782	13328	35951	13548	14112
82. DVVCQPQDRLRAL	16644	13255	33393	13756	14104

図 1 B - 1

配列	F4-465	281-1-10	2B11	F72	F76	4D11
1. EPPTACREKQYLI	20561	4194	14158	3965	3348	14138
2. PTACREKQYLINS	19249	4141	14276	3906	3420	14387
3. ACREKQYLINSQC	20418	4221	14276	3884	3300	14044
4. REKQYLINSQCCS	20278	4080	14214	3849	3546	13956
5. KQYLINSQCCSLC	19642	4169	14082	3806	3378	14443
6. YLINSQCCSLCQP	19658	4184	14231	4082	3464	14432
7. INSQCCSLCQPGQ	18482	4603	13927	3986	3157	13783
8. SQCCSLCQPGQKL	19075	4326	13748	3934	3675	13471
9. CCSLCQPGQKLVS	20282	4349	13578	4046	3336	13431
10. SLCQPGQKLVSDC	20175	4841	13522	3948	3222	13387
11. CQPGQKLVSDCTE	22520	4576	13441	4115	3566	13339
12. PGQKLVSDCTEFT	23688	4499	13618	4012	3525	13290
13. QKLVSDCTEFTET	22029	4771	13528	4294	3539	13450
14. LVSDCTEFTETEC	23692	5212	13439	4177	3601	14898
15. SDCTEFTETECPL	25950	4864	13359	4095	3362	13277
16. CTETETETECPLCG	20943	4906	13496	4121	3582	13874
17. EFTETECPLCGES	37123	4748	13570	3960	3402	16583
18. TETECPLCGESEF	23400	4807	13444	3811	3407	13808
19. TECPLCGESEFLD	21427	4649	13352	3970	3288	13566
20. CLPCGESEFLDTW	18021	4794	19449	3940	5926	47209
21. PCGESEFLDTWNR	26480	7656	86887	5478	16438	165895
22. GESEFLDTWNRET	25229	4906	24124	4337	4362	32083
23. SEFLDTWNRETHC	23274	5979	30344	4138	4083	72724
24. FLDTWNRETHCHQ	28280	19544	120439	4636	6401	336496
25. DTWNRETHCHQHK	20114	4107	14285	4029	3459	14028
26. WNRETHCHQHXYC	21110	4714	16070	4111	3819	25715
27. RETHCHQHXYCDP	19452	4075	13942	4000	3252	13812
28. THCHQHXYCDPNL	18412	4221	14203	3912	3459	14295
29. CHQHXYCDPNLGL	18890	4288	16566	4025	3473	13886
30. QHXYCDPNLGLRV	19296	4313	13580	4132	3383	13355
31. KYCDPNLGLRVQQ	20430	4460	13469	4254	3651	13357
32. CDPNLGLRVQQKG	28700	4570	13568	5394	4575	13336
33. PNLGLRVQQKGTS	39822	5229	13590	24278	6996	13404
34. LGLRVQQKGTSSET	52908	4681	13651	7042	4112	13400
35. LRVQQKGTSSETDT	56985	4376	13514	4839	16679	13557
36. VQQKGTSSETDTIC	21684	4531	13423	3960	3258	13355
37. QKGTSSETDTICTC	21838	4509	13507	3975	3355	13365
38. GTSETDTICTCEE	21896	4074	13348	3856	3298	13453
39. SETDTICTCEEGW	18789	4082	13377	3687	3297	13606
40. TDTICTCEEGWHC	17729	4187	13485	3756	3638	19679

図 1 B - 2

配列	F4-465	281-1-10	2B11	F72	F76	4D11
41. TICTCEEGWHCTS	22932	4207	14559	4151	3992	46128
42. CTCBEGWHCTSEA	22823	4167	14428	4077	3394	14309
43. CEEGWHCTSEACE	25545	4071	14192	4118	3375	14162
44. EGWHCTSEACESC	23461	4272	14290	4171	3393	14029
45. WHCTSEACESCVL	20999	4198	14136	4318	3465	14065
46. CTSEACESCVLHR	20553	4273	14301	4152	3396	14337
47. SEACESCVLHRSC	20792	4234	13900	4122	3439	13877
48. ACESCVLHRSCSP	21816	4179	13741	3934	3525	13539
49. ESCVLHRSCSPGF	20599	4725	13758	4141	3514	13658
50. CVLHRSCSPGFGV	19851	4393	13533	4127	3526	13320
51. LHRSCSPGFGVKQ	23160	4317	13486	4851	18376	13355
52. RSCSPGFGVKQIA	24797	4495	13728	5568	15564	13375
53. CSPGFGVKQIATG	30890	4962	13400	8711	3383	13340
54. PGFGVKQIATGVS	82448	5027	13415	11404	4102	13378
55. FGVKQIATGVSDT	126309	4541	13423	4896	3515	13474
56. VKQIATGVSDTIC	32389	4361	13454	4040	3278	13305
57. QIATGVSDTICEP	28554	4308	13325	3807	3318	13350
58. ATGVSDTICEPCP	22484	4176	13463	3868	3241	13399
59. GVSdTICEPCPVG	21417	4277	13329	3584	3259	13475
60. SDTICEPCPVGFF	20192	4360	13337	3725	3358	14425
61. TICEPCPVGFFSN	25475	4390	14453	4101	3446	15502
62. CEPVGVGFFSNVS	26387	4419	14370	4434	3538	14441
63. PCPVGVGFFSNVSA	40241	4468	14425	4363	3409	14664
64. PVGVGFFSNVSAFE	27432	11225	85432	4772	5735	49493
65. GFFSNVSAFEKFC	77408	4483	14462	4173	3489	14521
66. FSNVSAFEKCHP	57923	4088	14050	4230	3296	13989
67. NVSAFEKCHPWT	23154	4031	13752	4025	3343	13619
68. SSAFEKCHPWTS	20994	4170	13512	4006	3419	13466
69. AFEKCHPWTSCT	21390	4498	13629	4028	3413	13518
70. EKCHPWTSCTKD	19639	4186	13571	3911	3403	16038
71. CHPWTSCTKDLV	20967	4216	13608	4177	3489	13283
72. PWTSCETKDLVVQ	23271	4300	13420	4459	3316	13507
73. TSCETKDLVVQQA	26353	4690	13457	4411	3496	13462
74. CETKDLVVQAGT	26955	4517	13389	4600	3403	13433
75. TKDLVVQAGTNK	63164	6695	13475	60382	7609	13271
76. DLVVQAGTNKTD	25820	4567	13537	4057	3585	13328
77. VVQAGTNKTDVV	28426	4587	13372	4179	3418	13309
78. QQAGTNKTDVVC	19474	4111	13455	3709	3809	13332
79. AGTNKTDVVCQP	18988	4186	13517	3868	3231	13436
80. TNKTDVVCQPDR	18178	4662	13423	3654	4897	13350
81. KTDVVCQPDRRL	27431	4208	13879	4242	4238	13779
82. DVVCQPDRRLAL	28872	4127	14128	4179	3459	13855

図 2 A

CD40FC

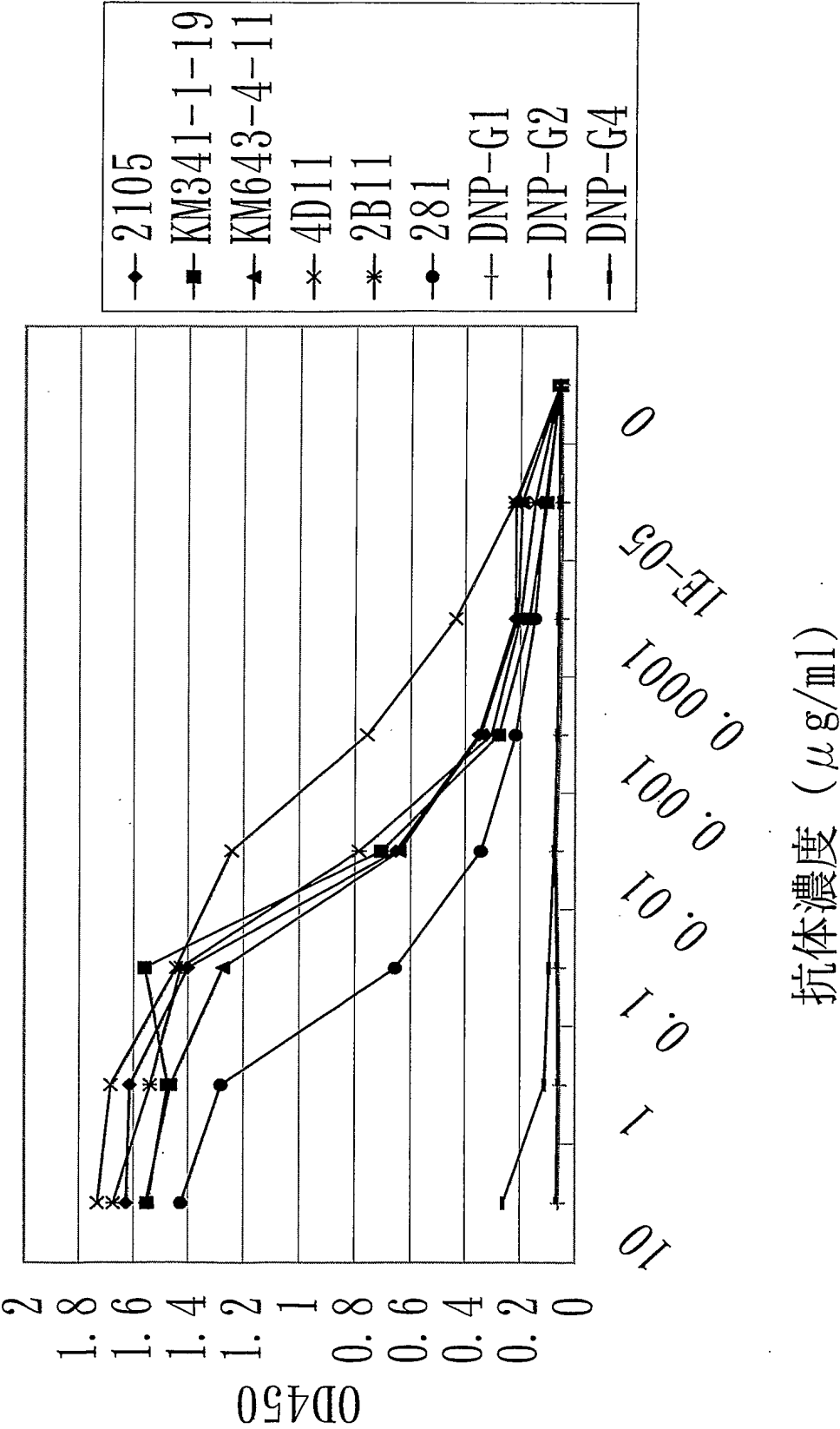


図 2 B

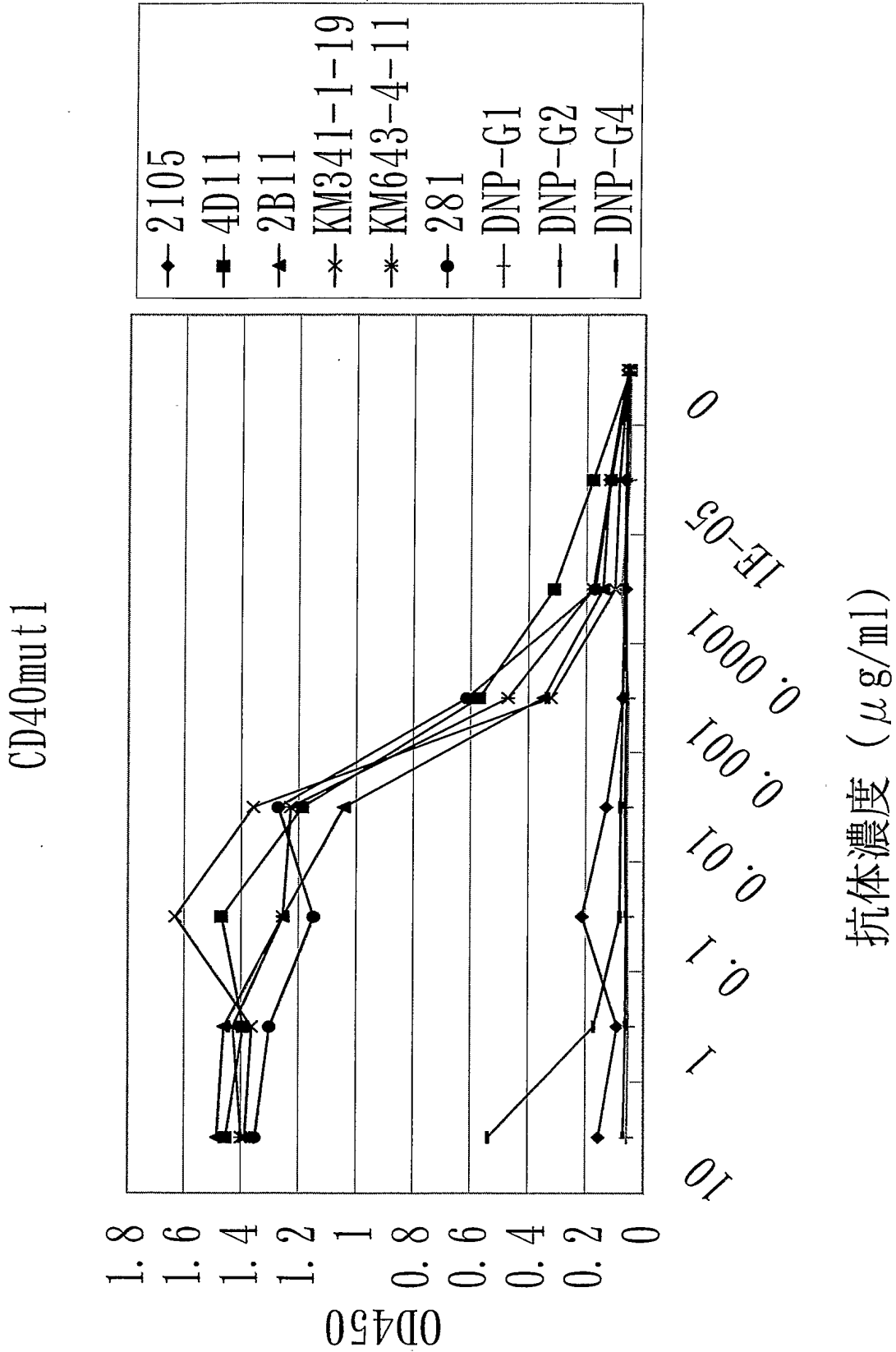


図 2C

CD40mut2

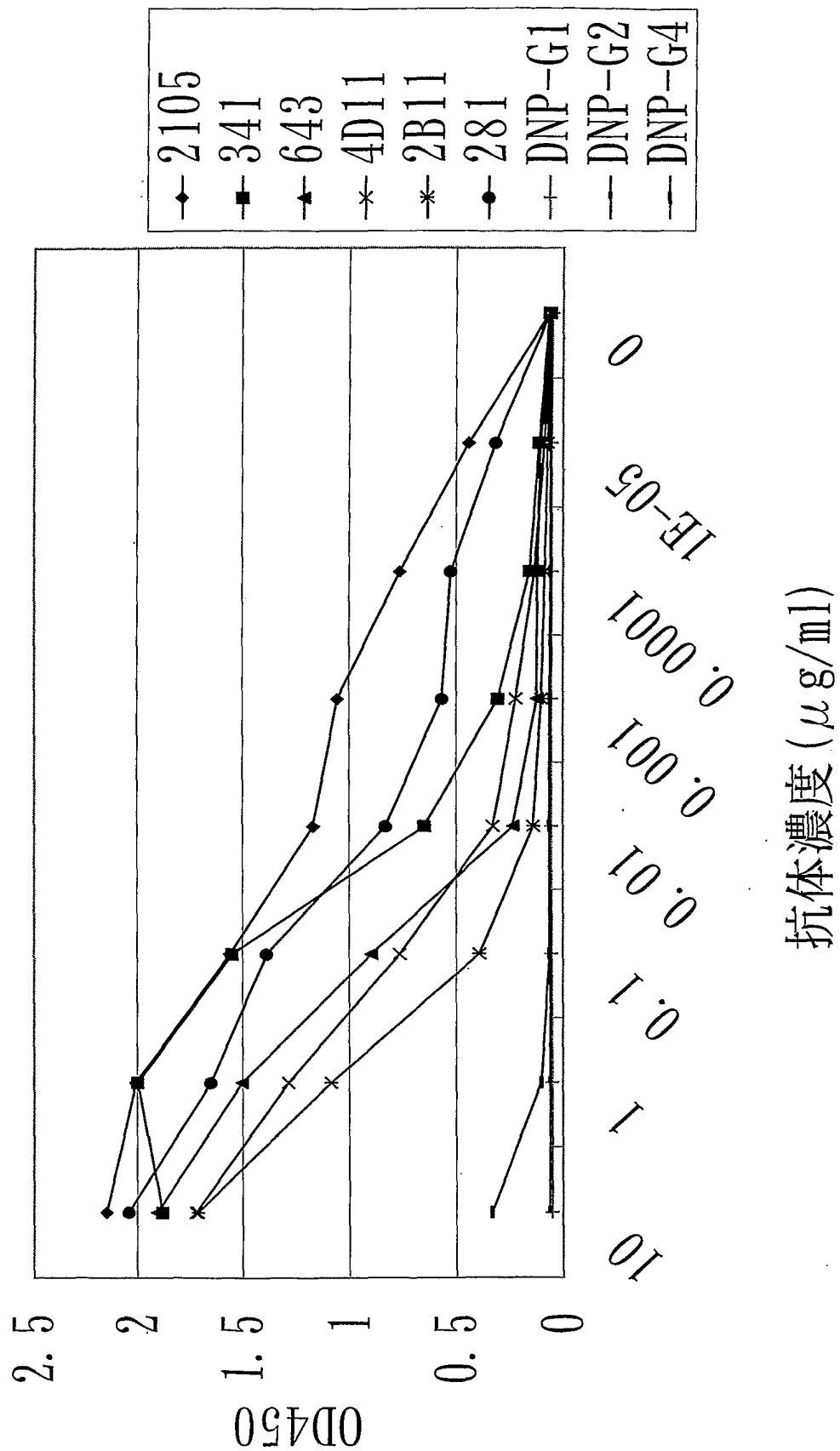


図 3 A

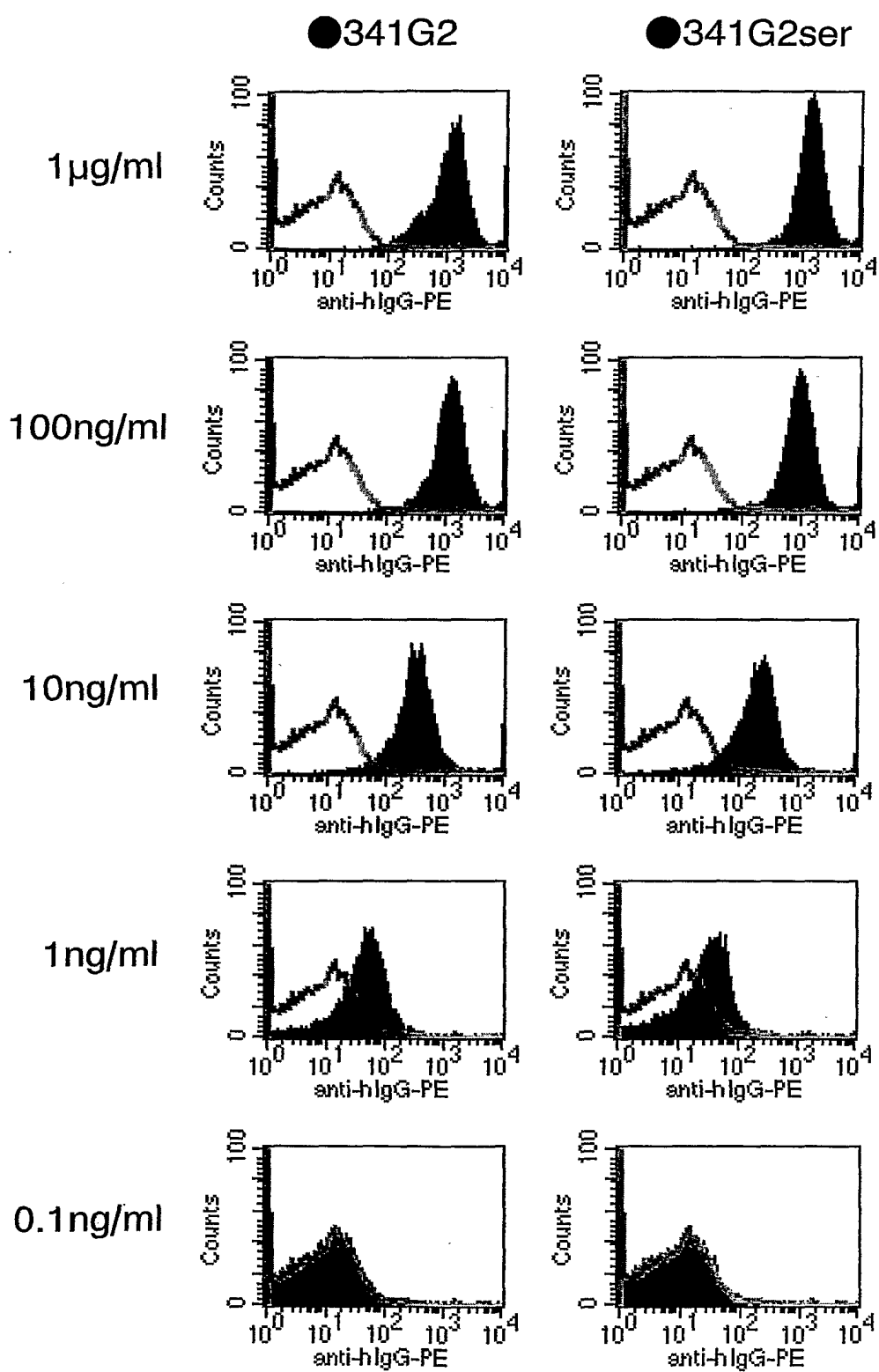


図 3 B

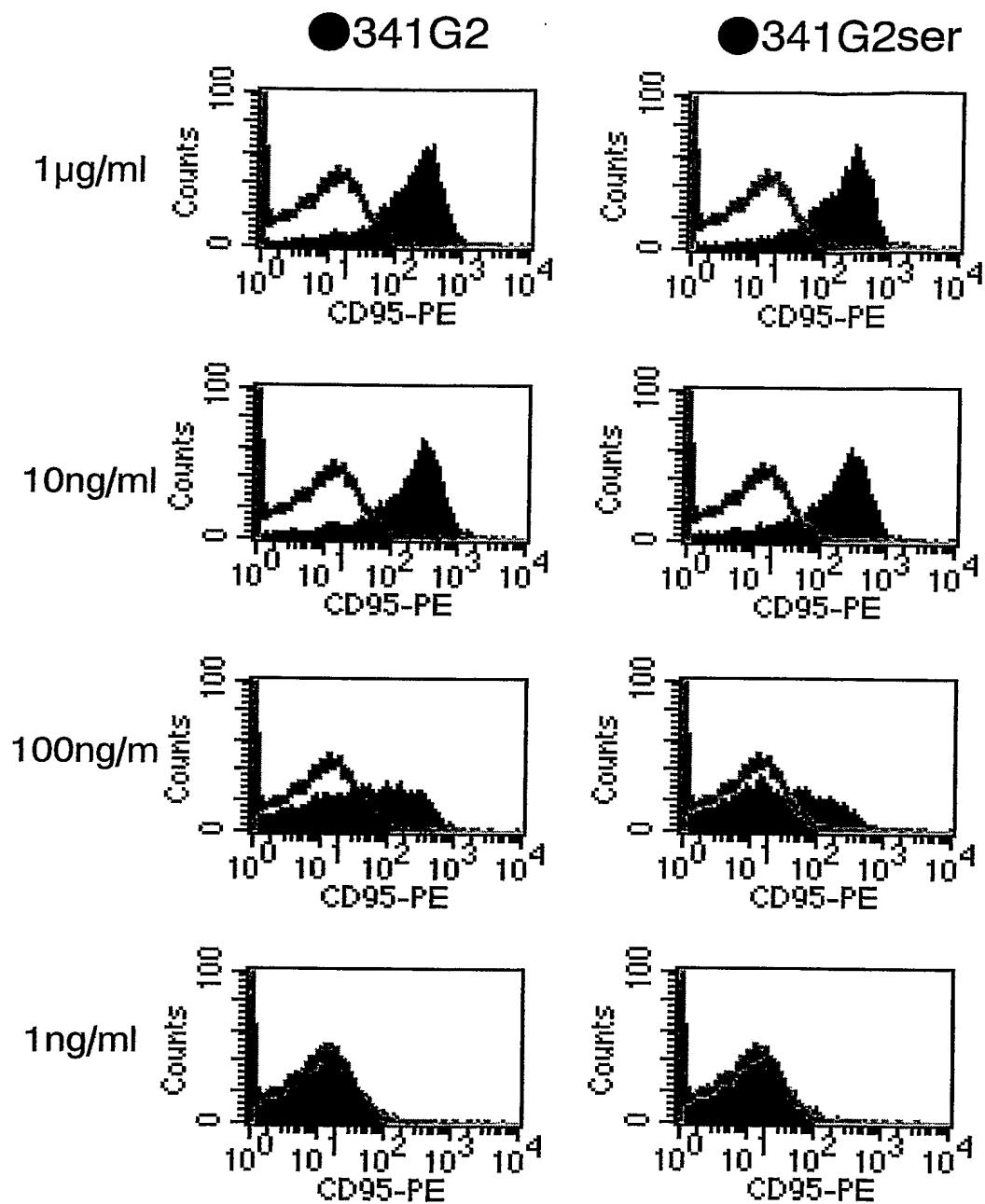


図 4 A

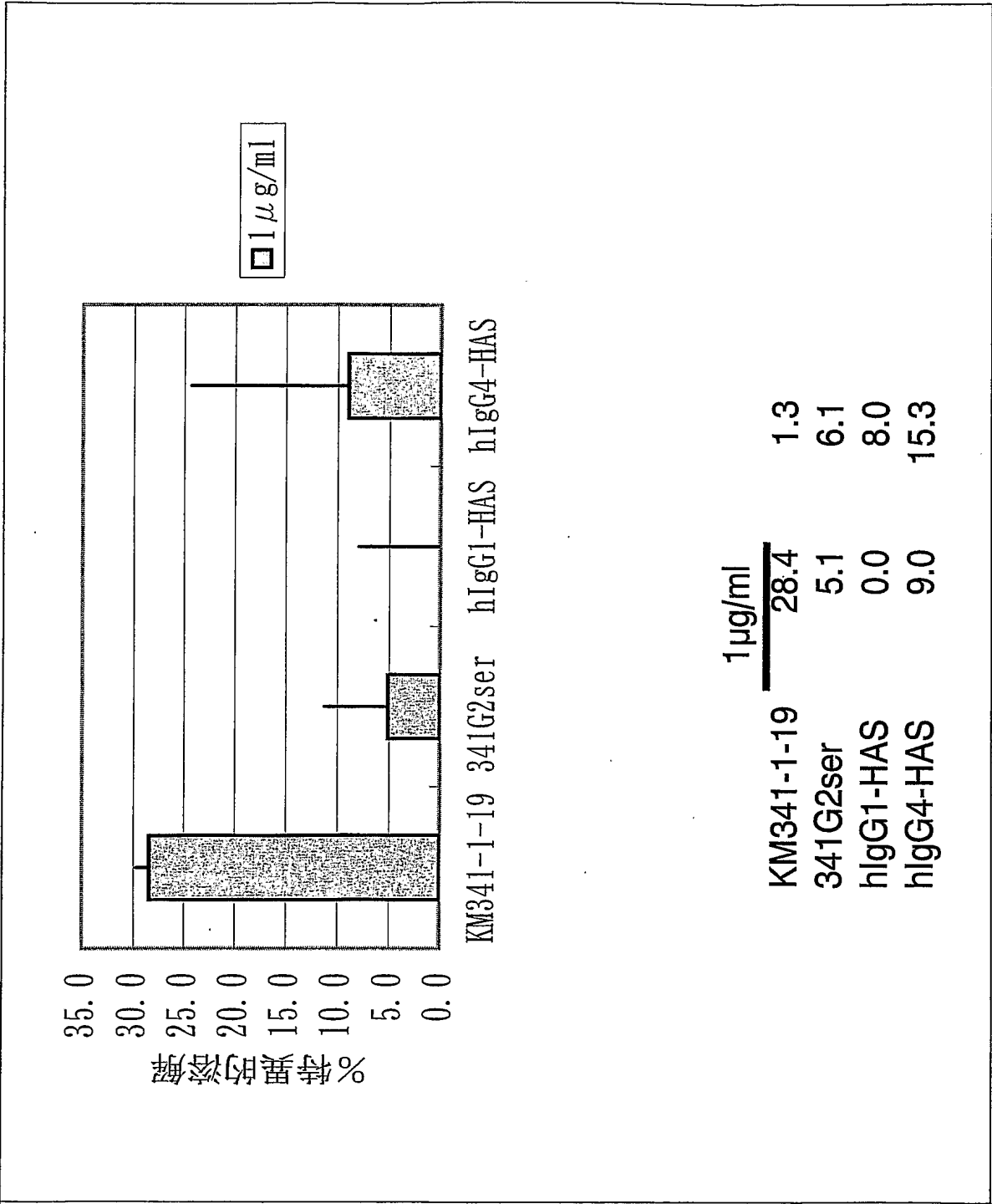


図 4 B

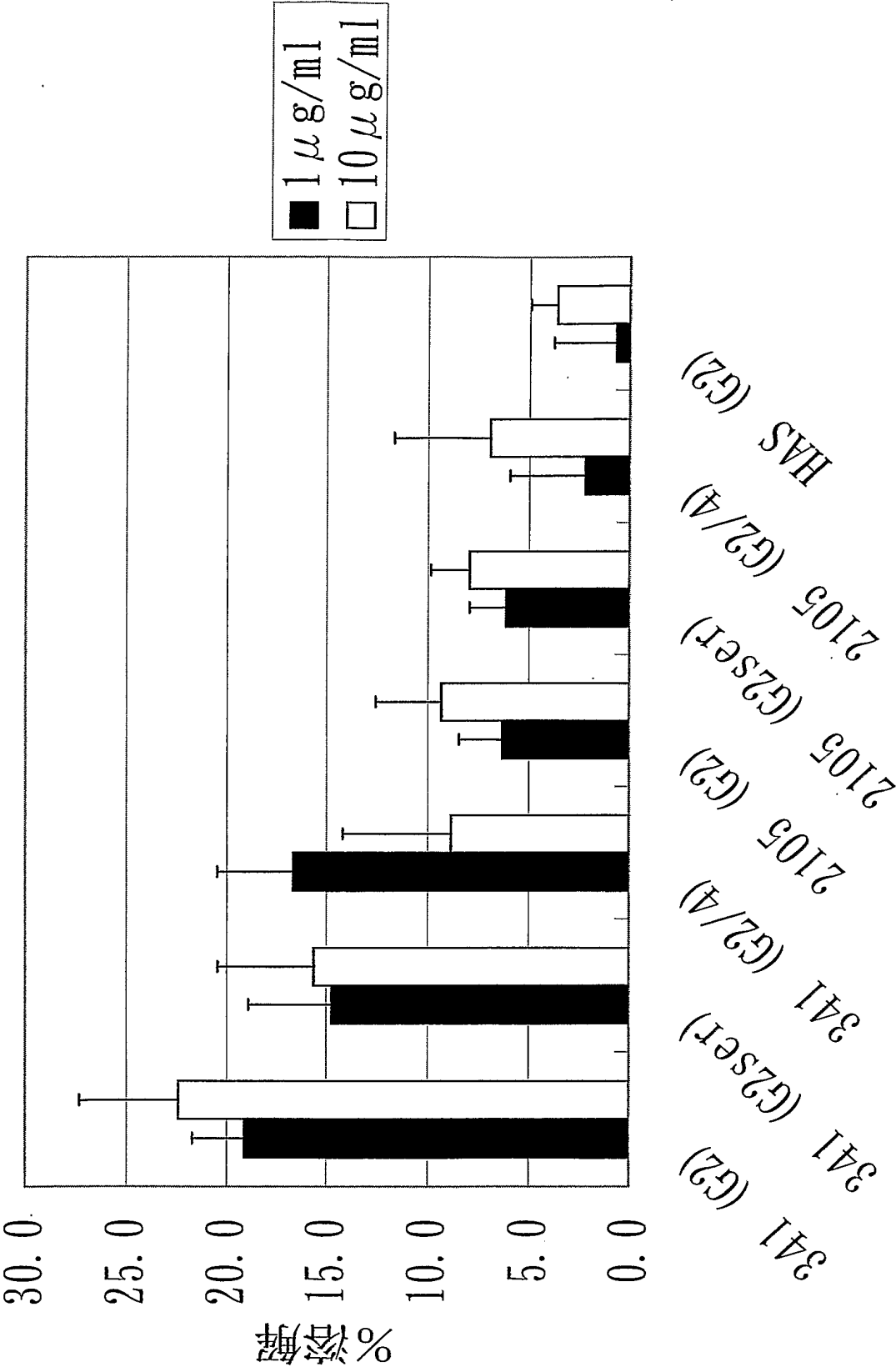


図 5 A - 1 [2105]

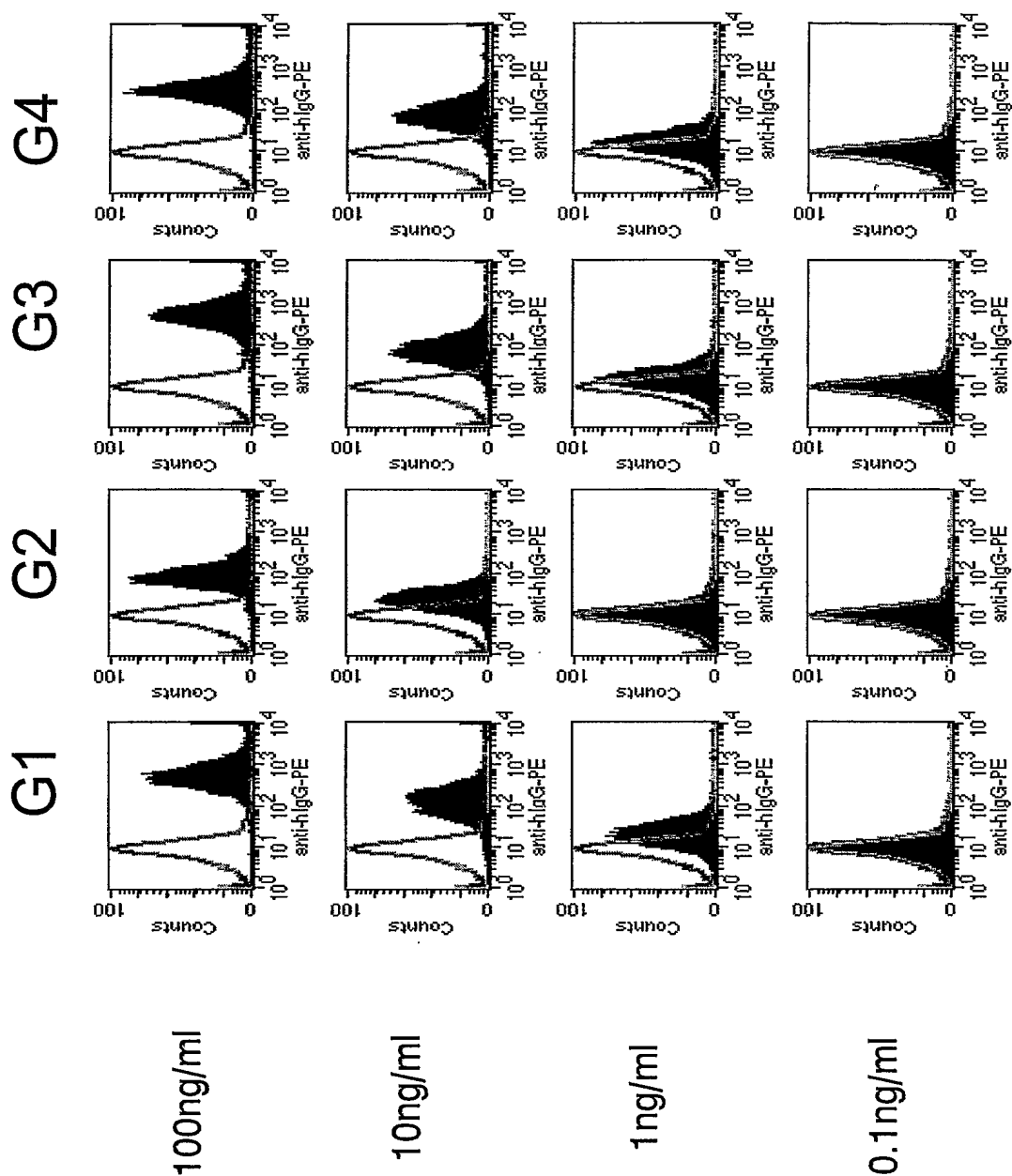


図 5A-2

[341]

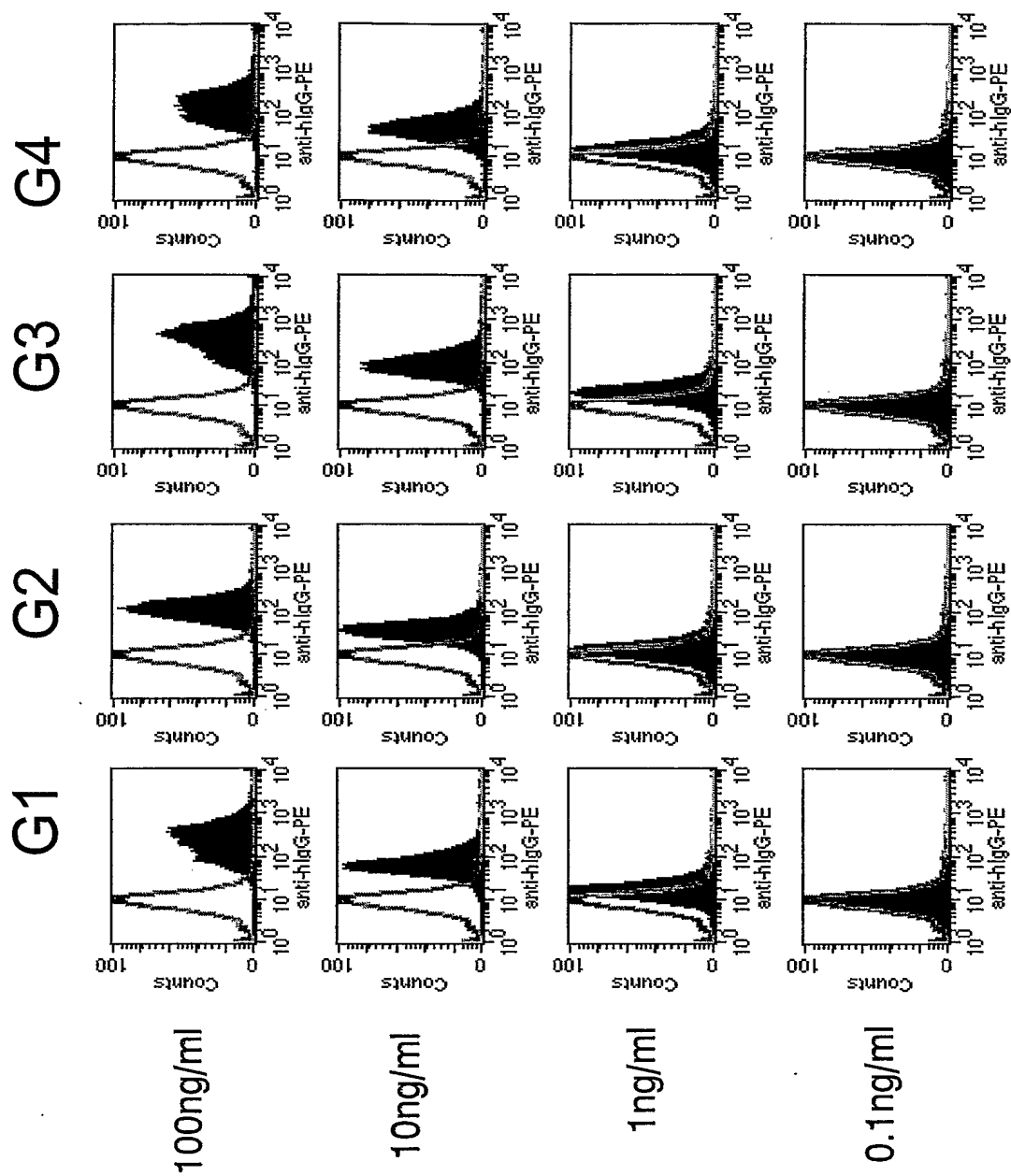


図 5 B - 1

[2105]

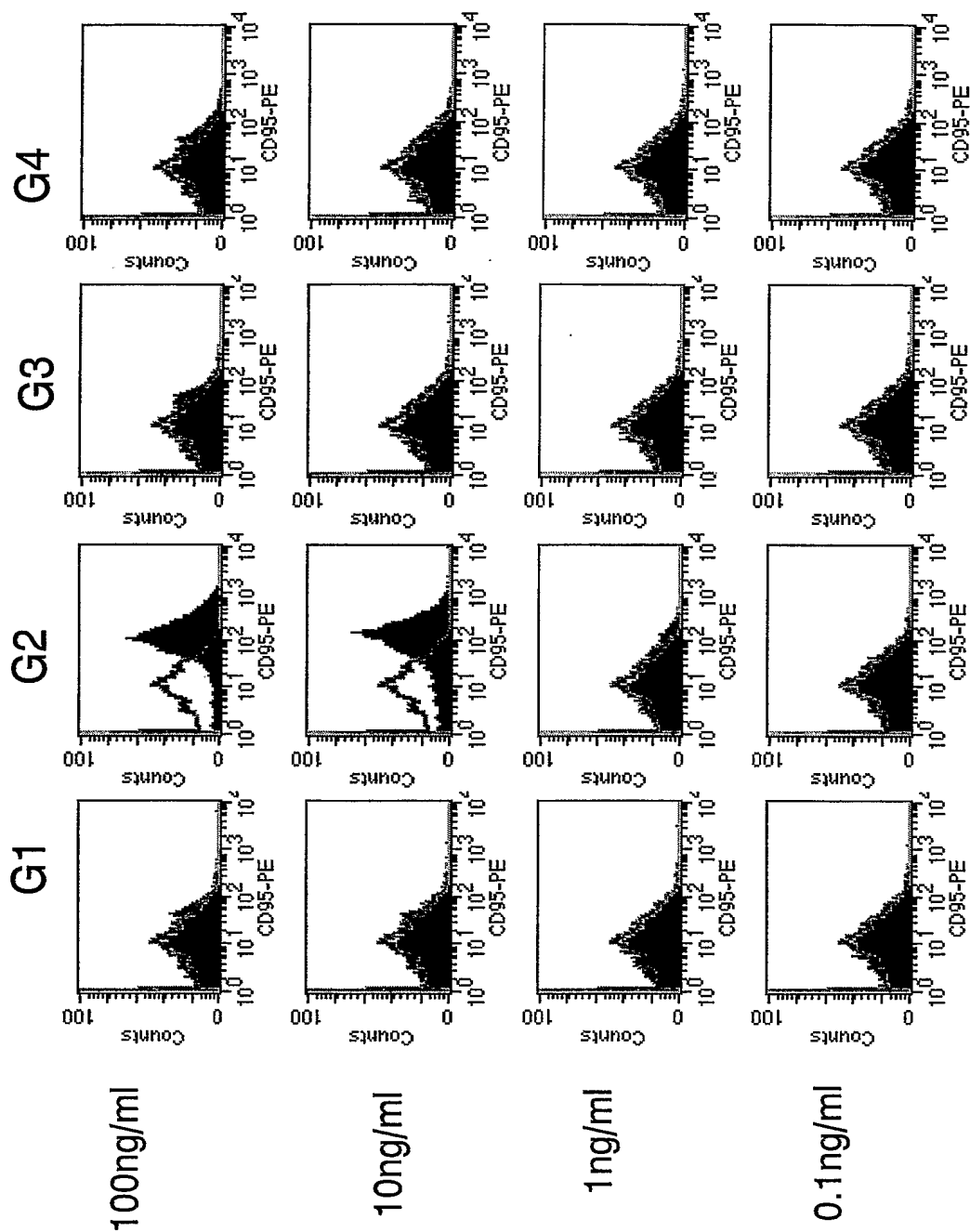


図 5 B - 2

[341]

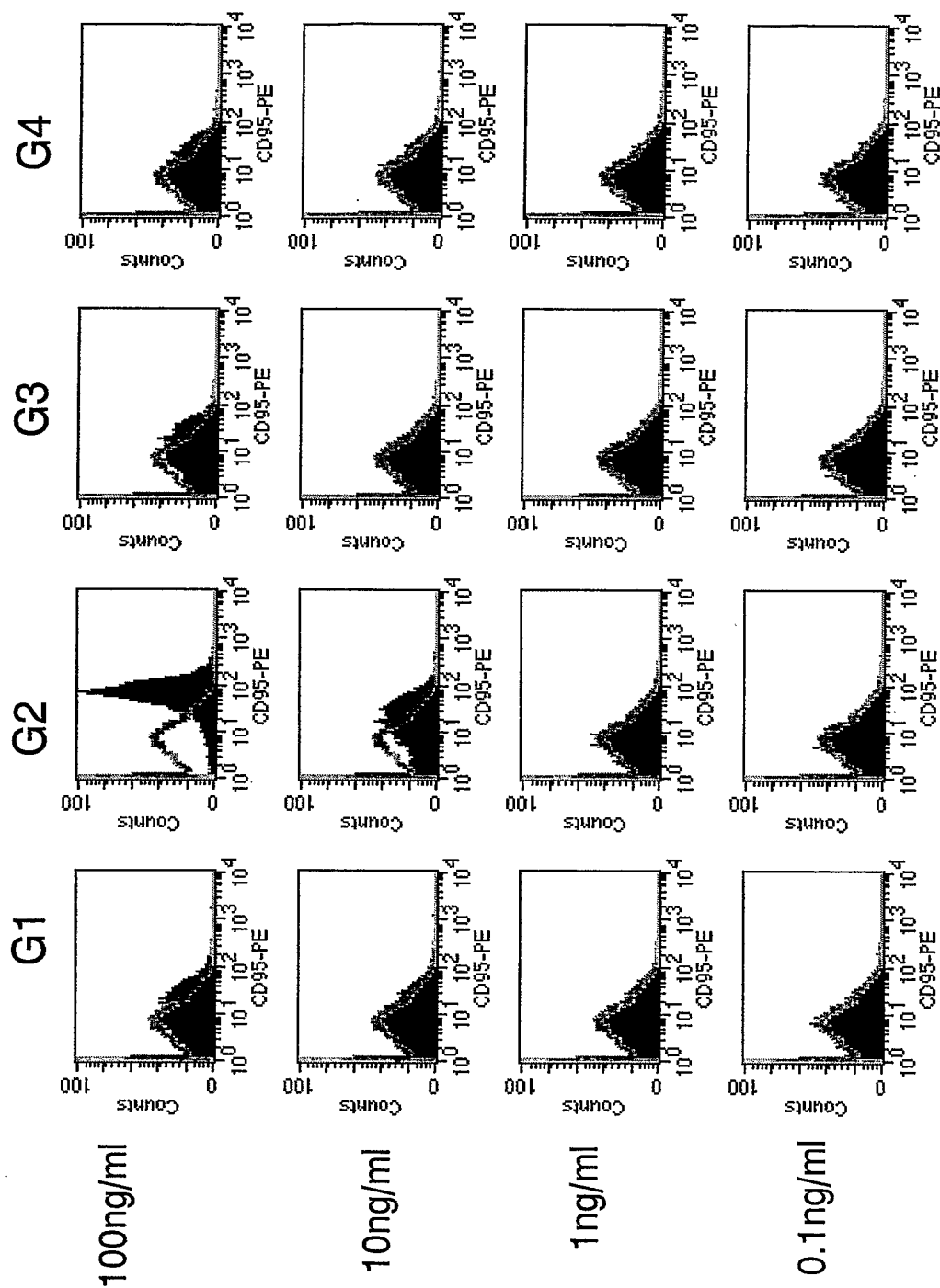


FIG 6 A - 1

[341]

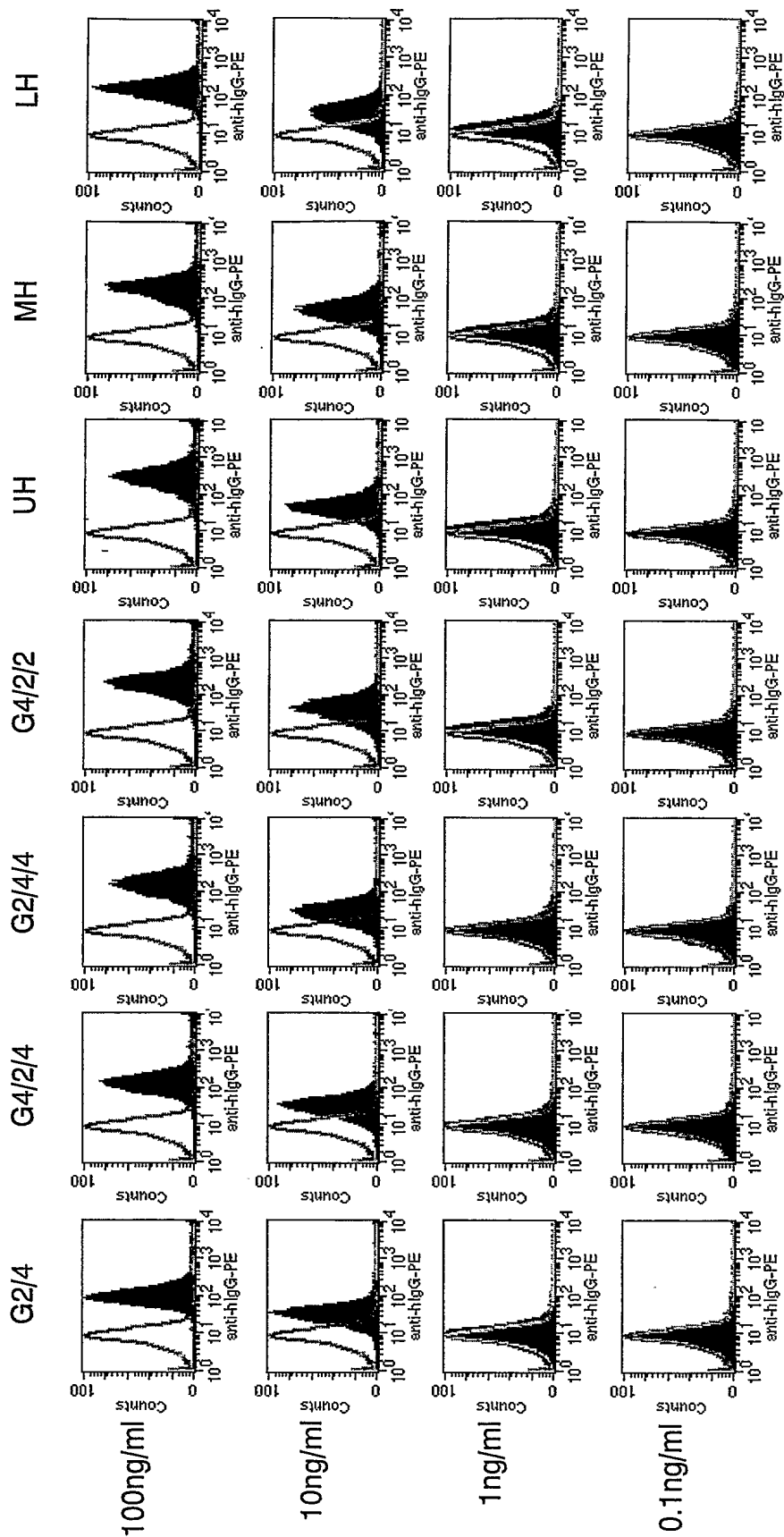


図 6 A - 2

[2105]

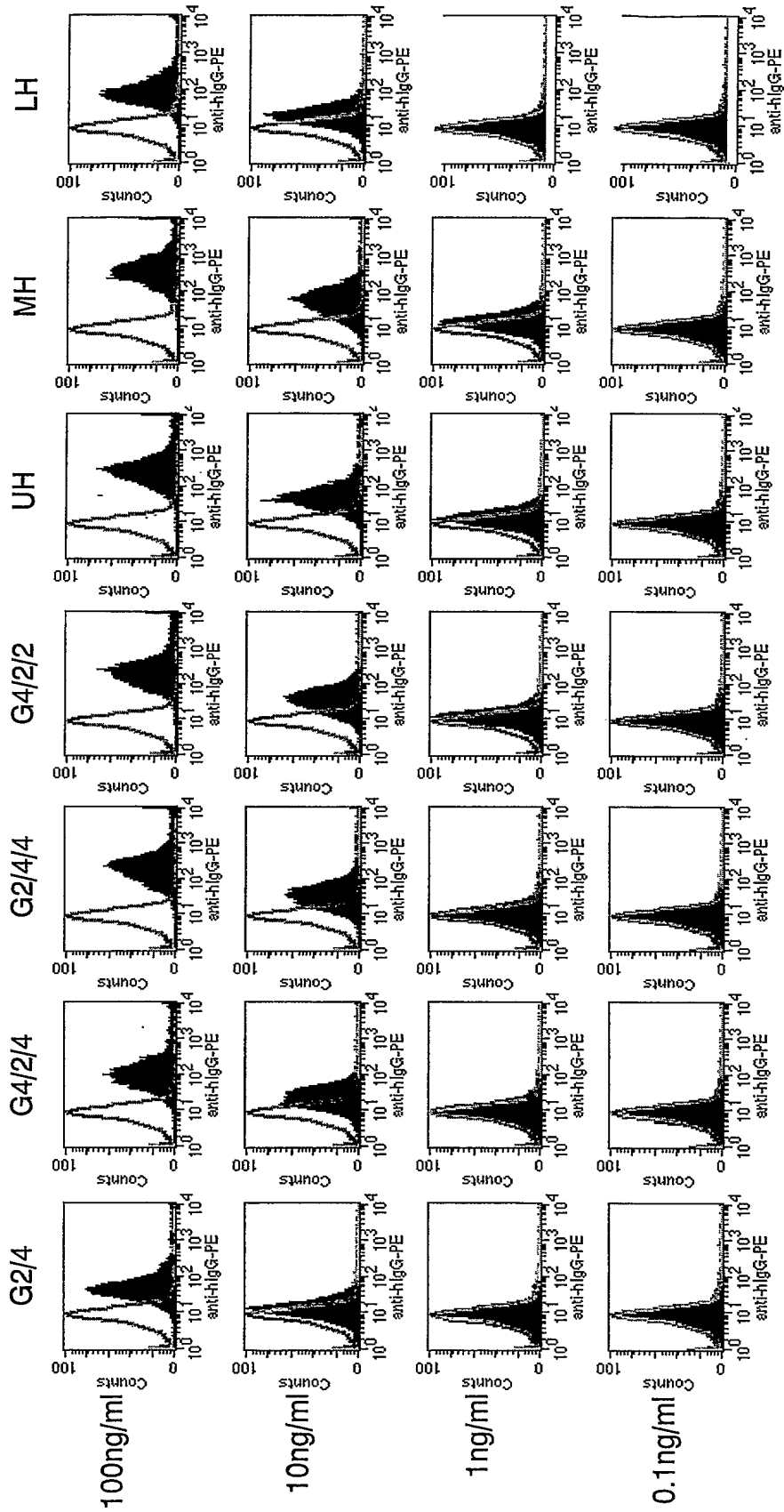


図 6 B - 1

[341]

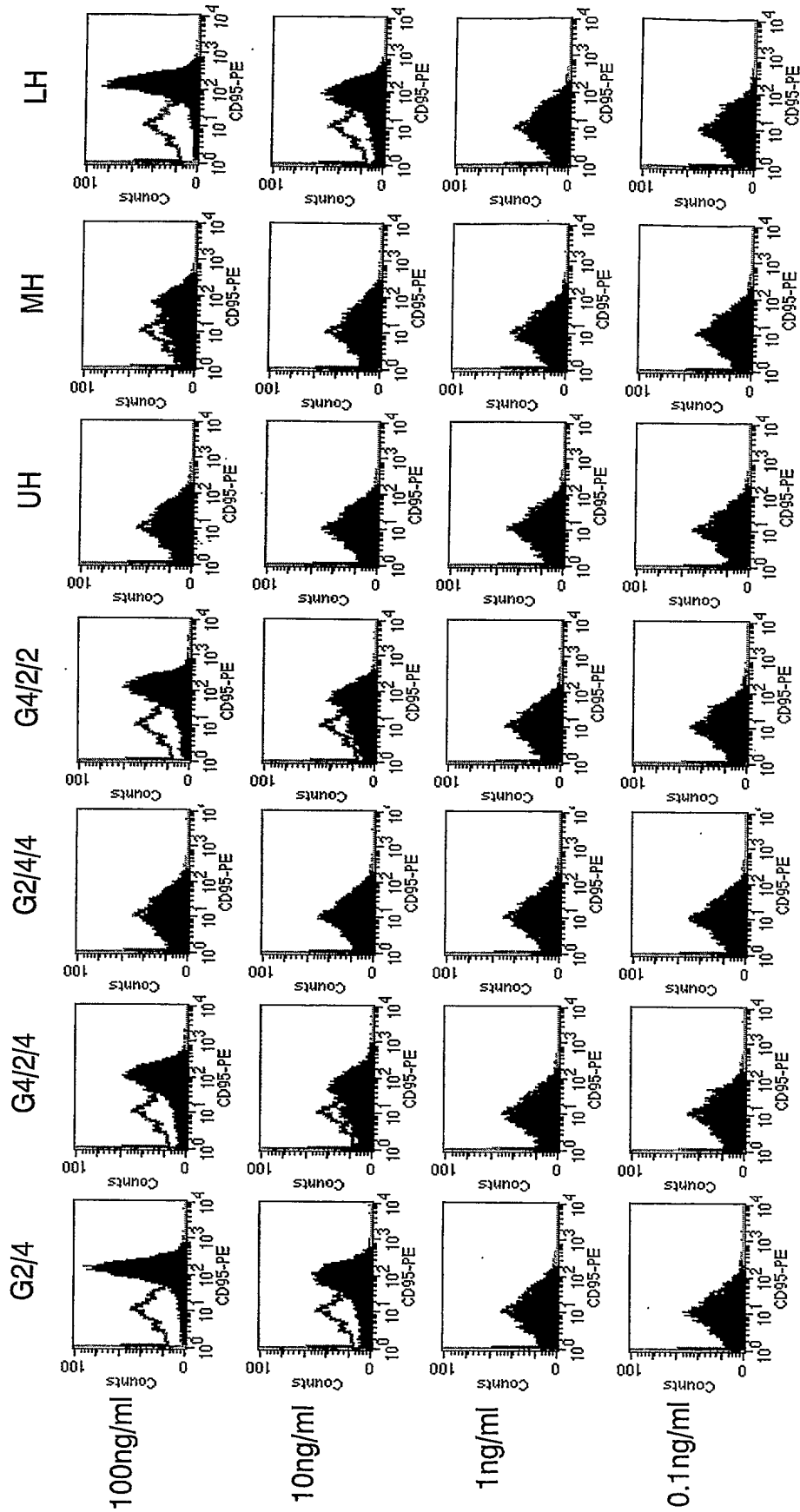


図 6 B - 2

[2105]

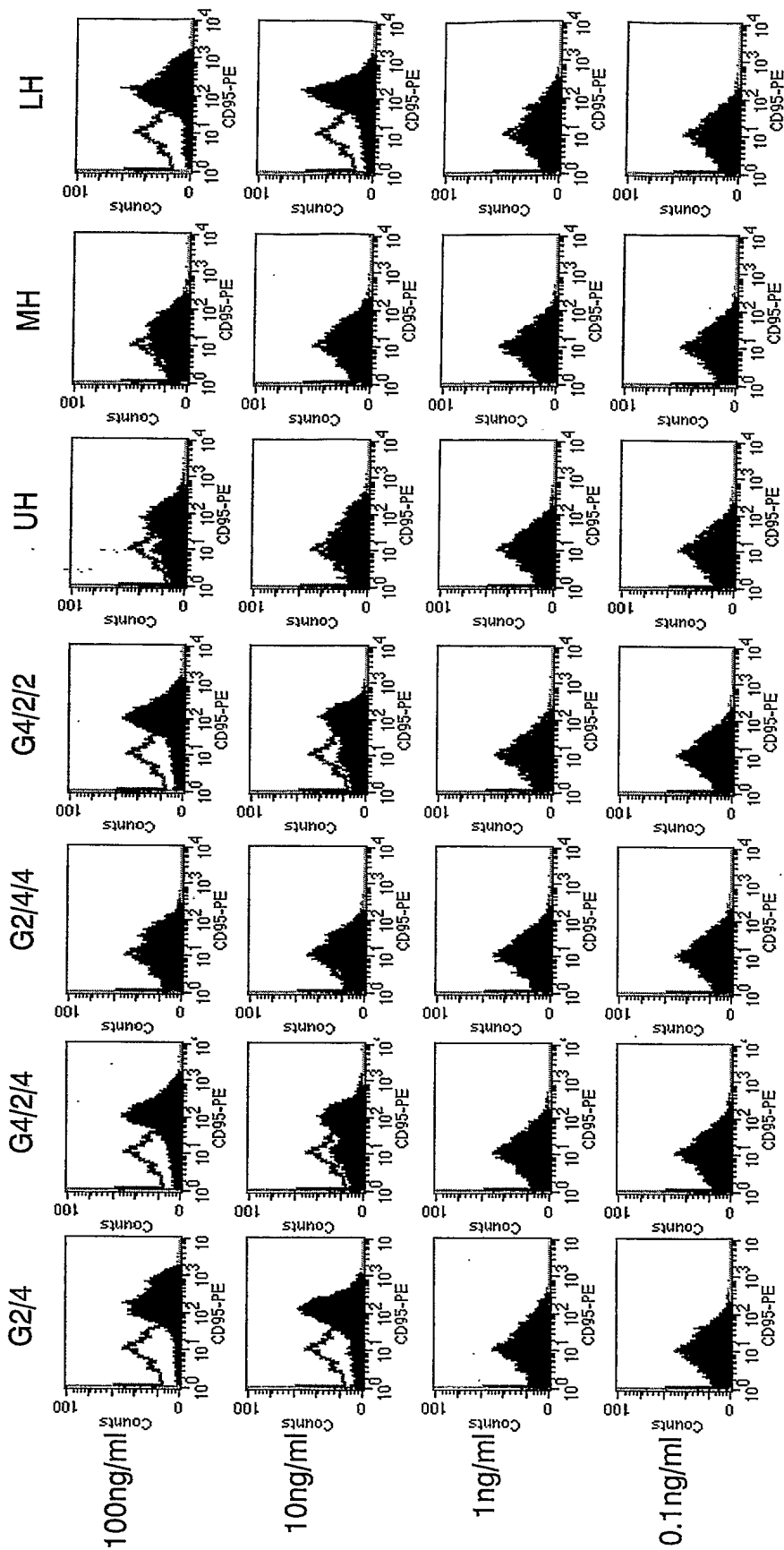


図 7 A

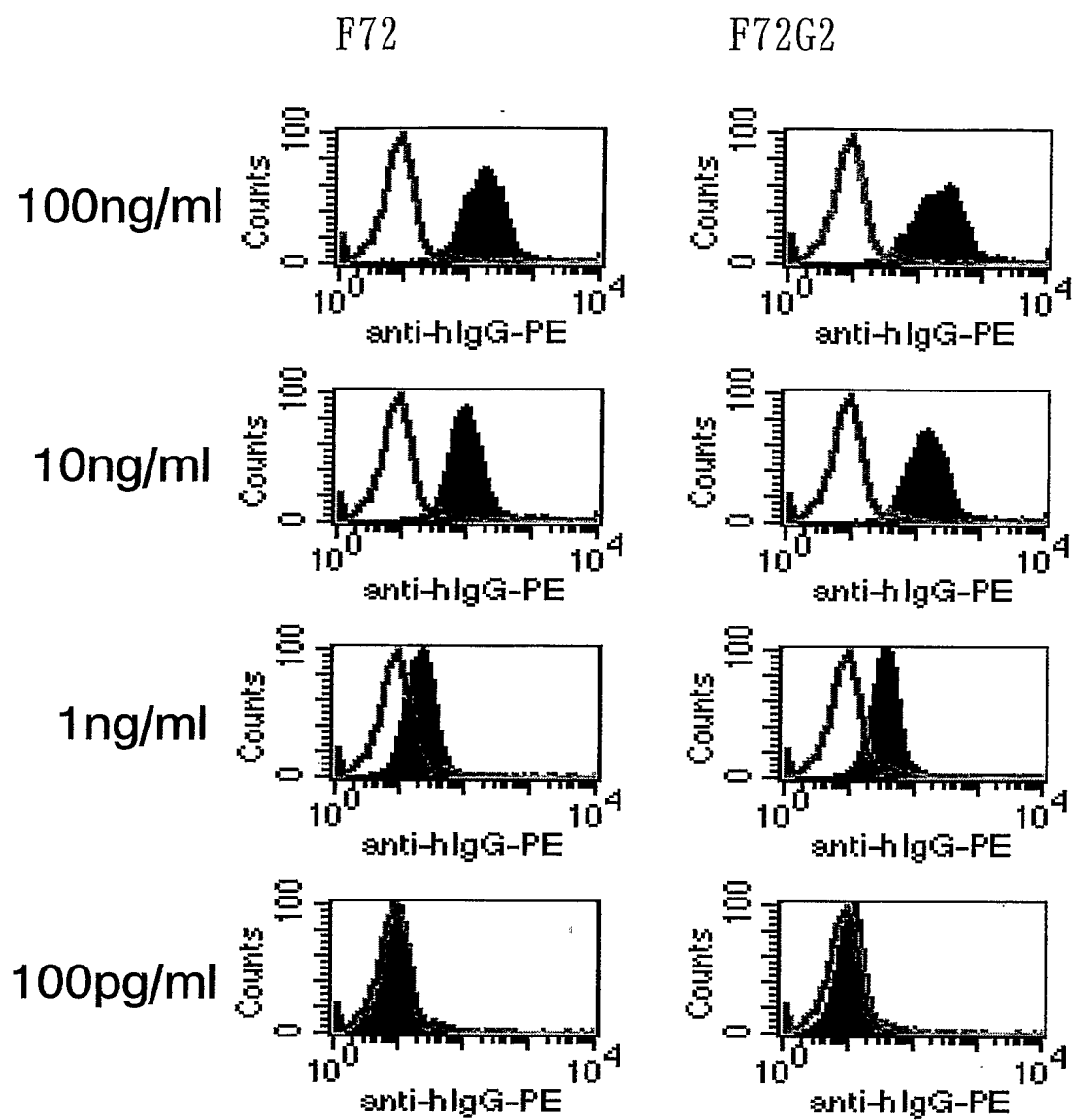


図 7 B

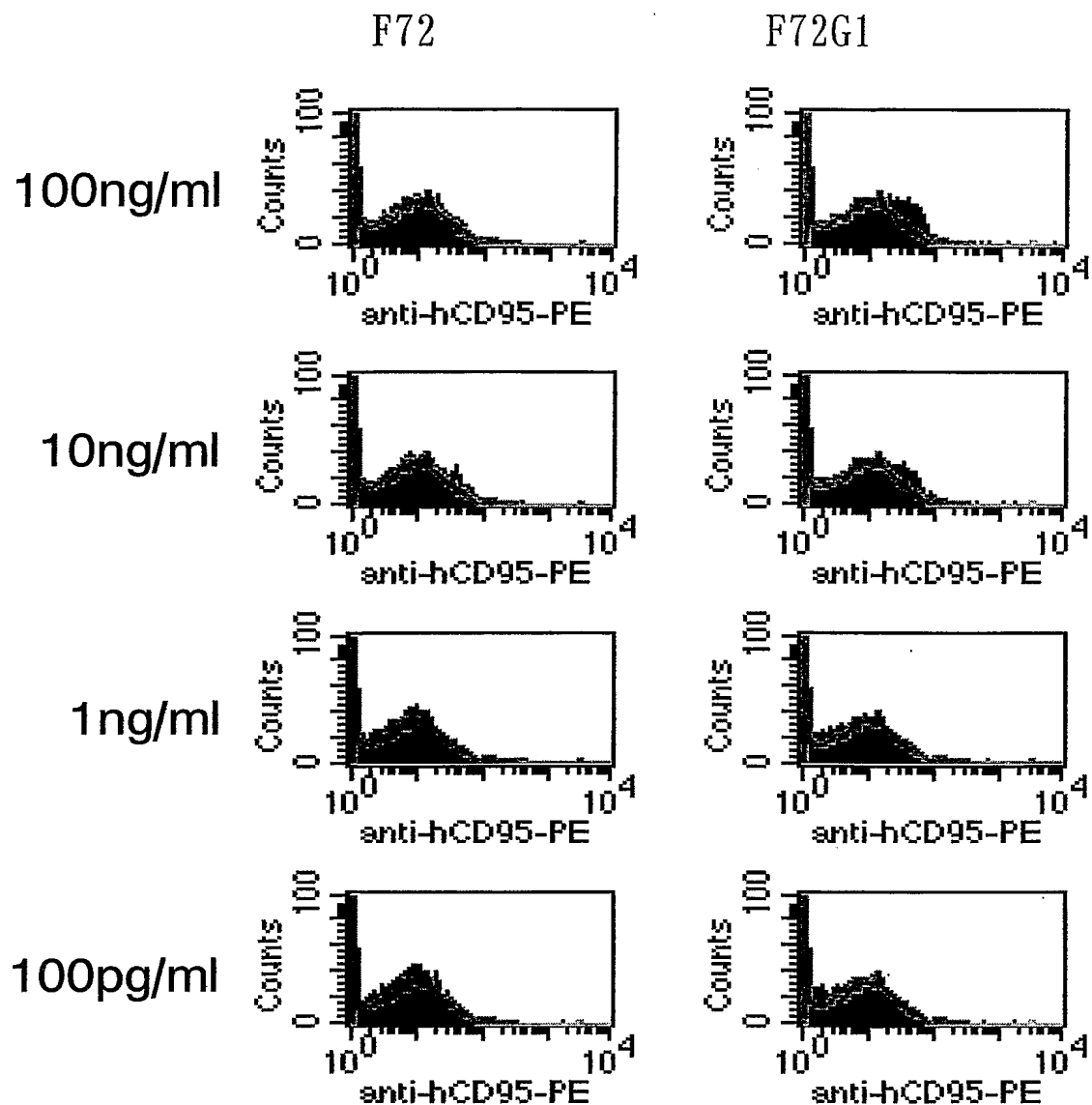


図 8 A

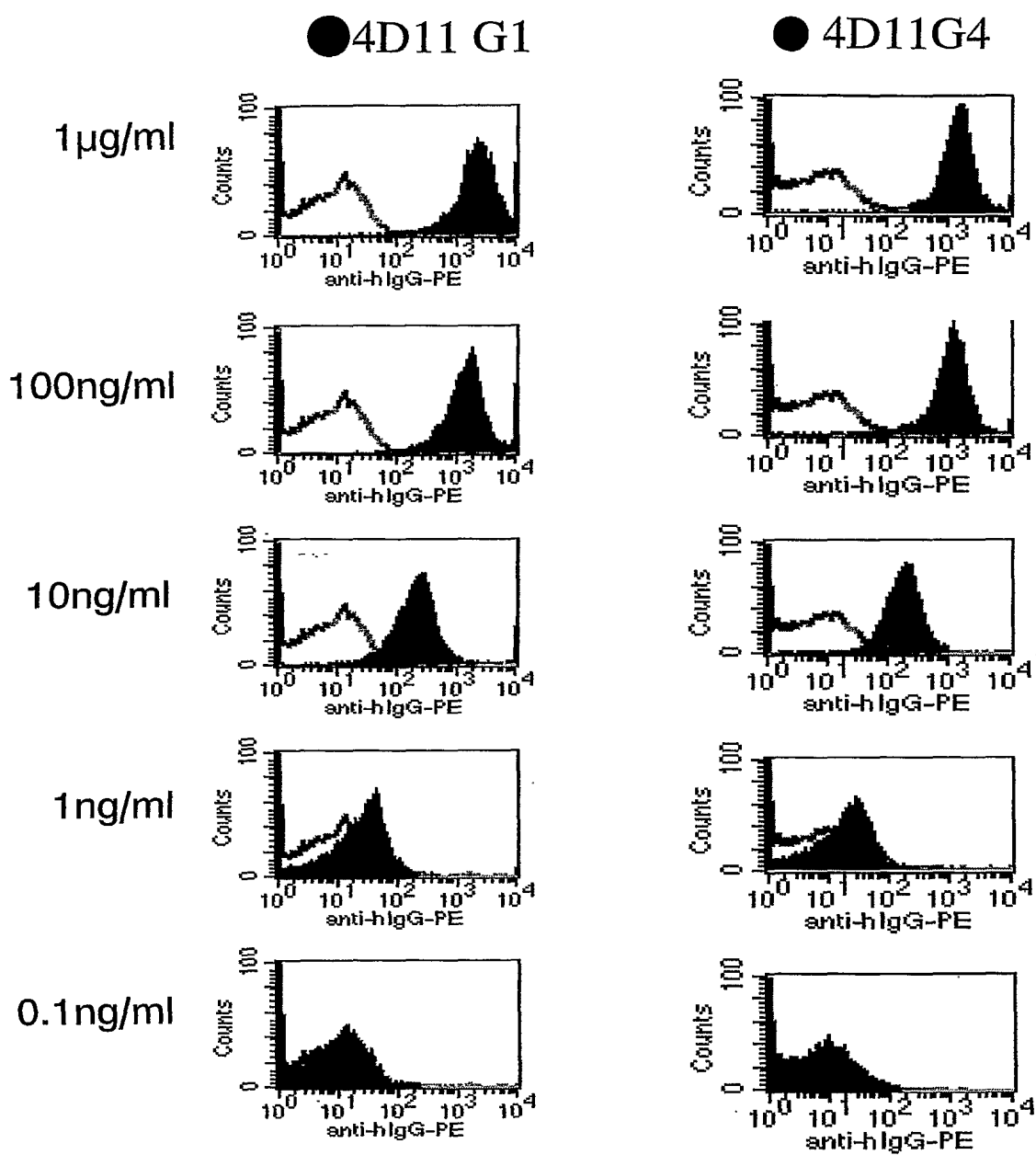


図 8 B

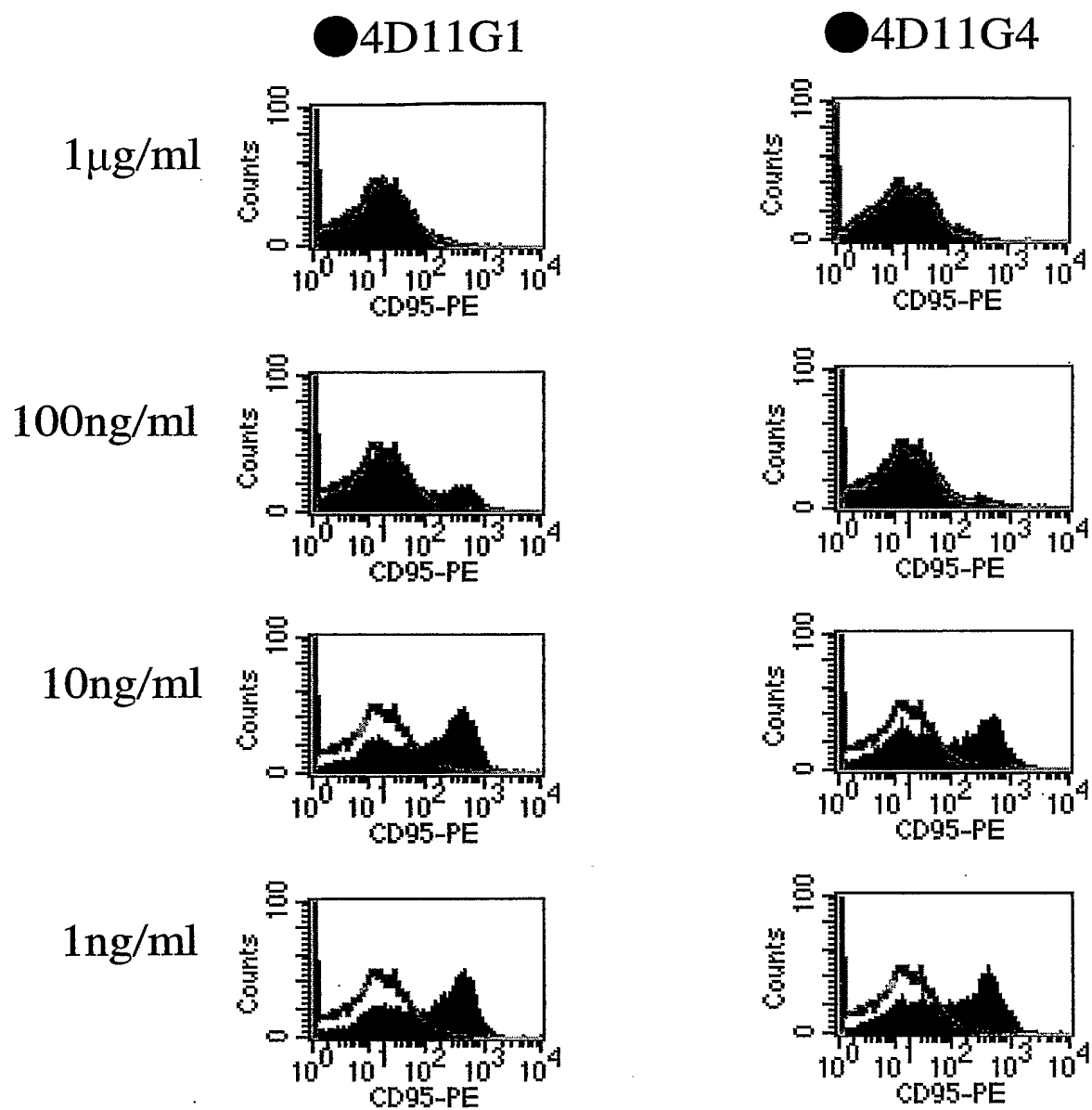


図9

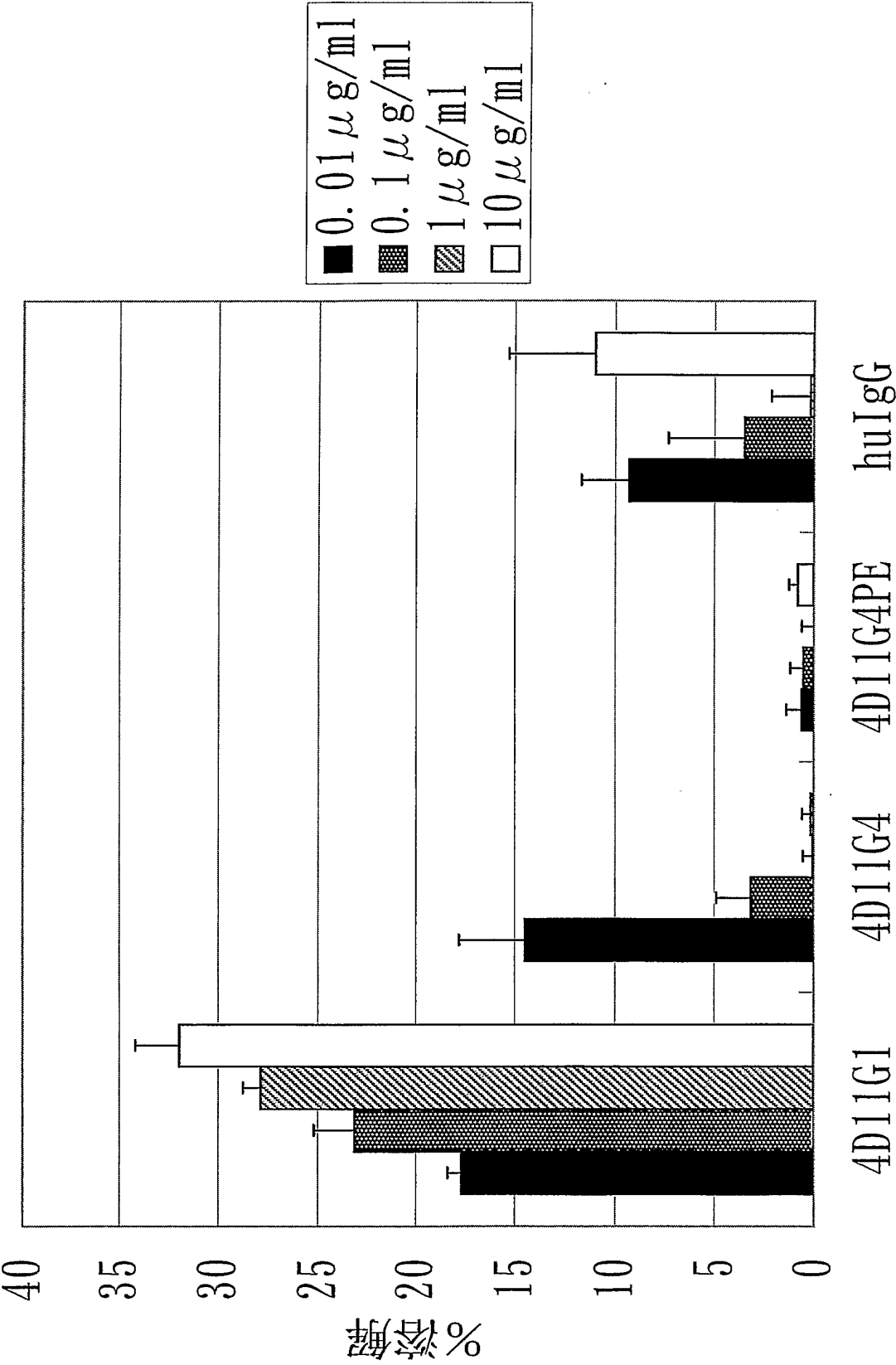


図 10

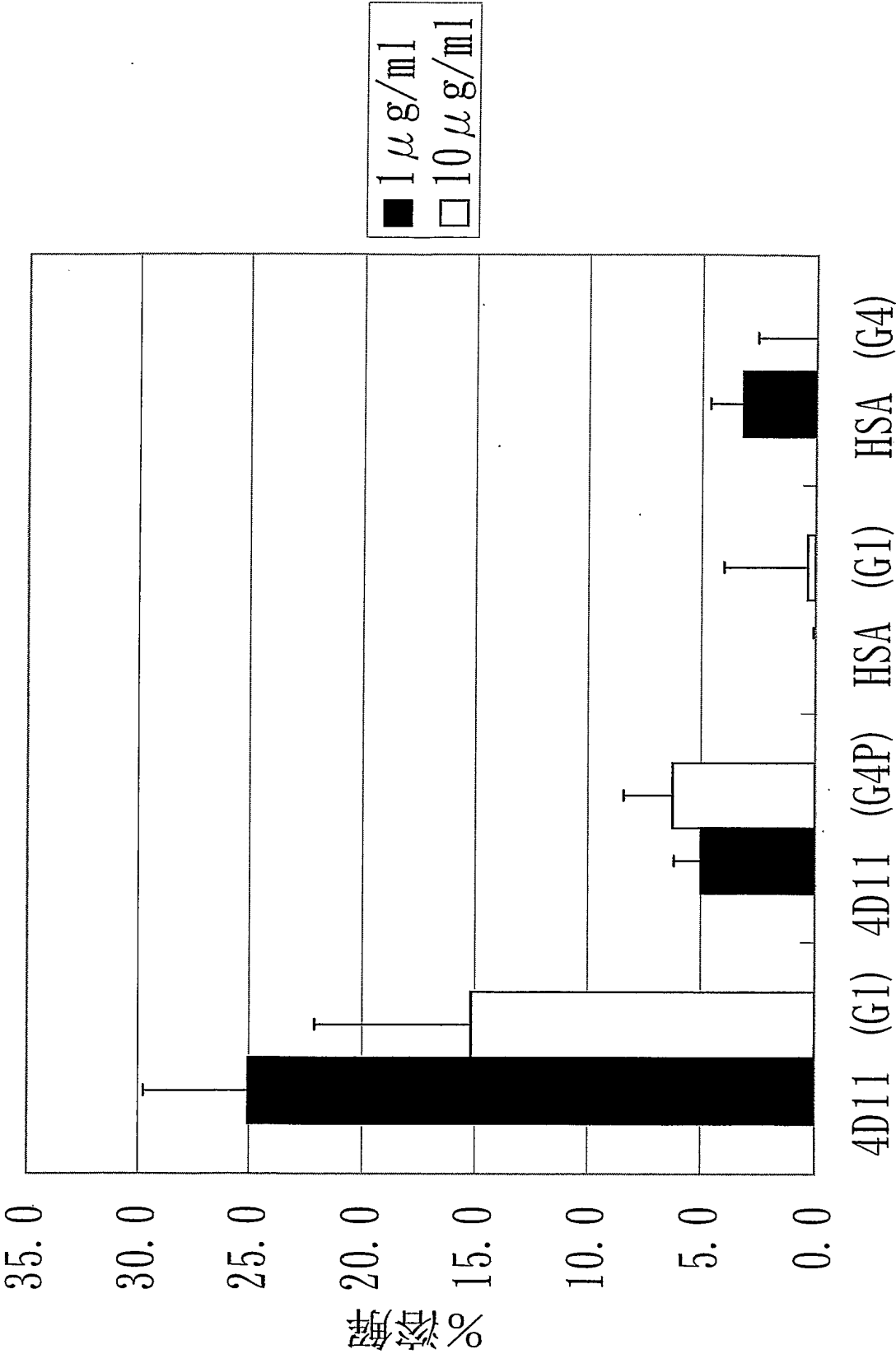


図 11

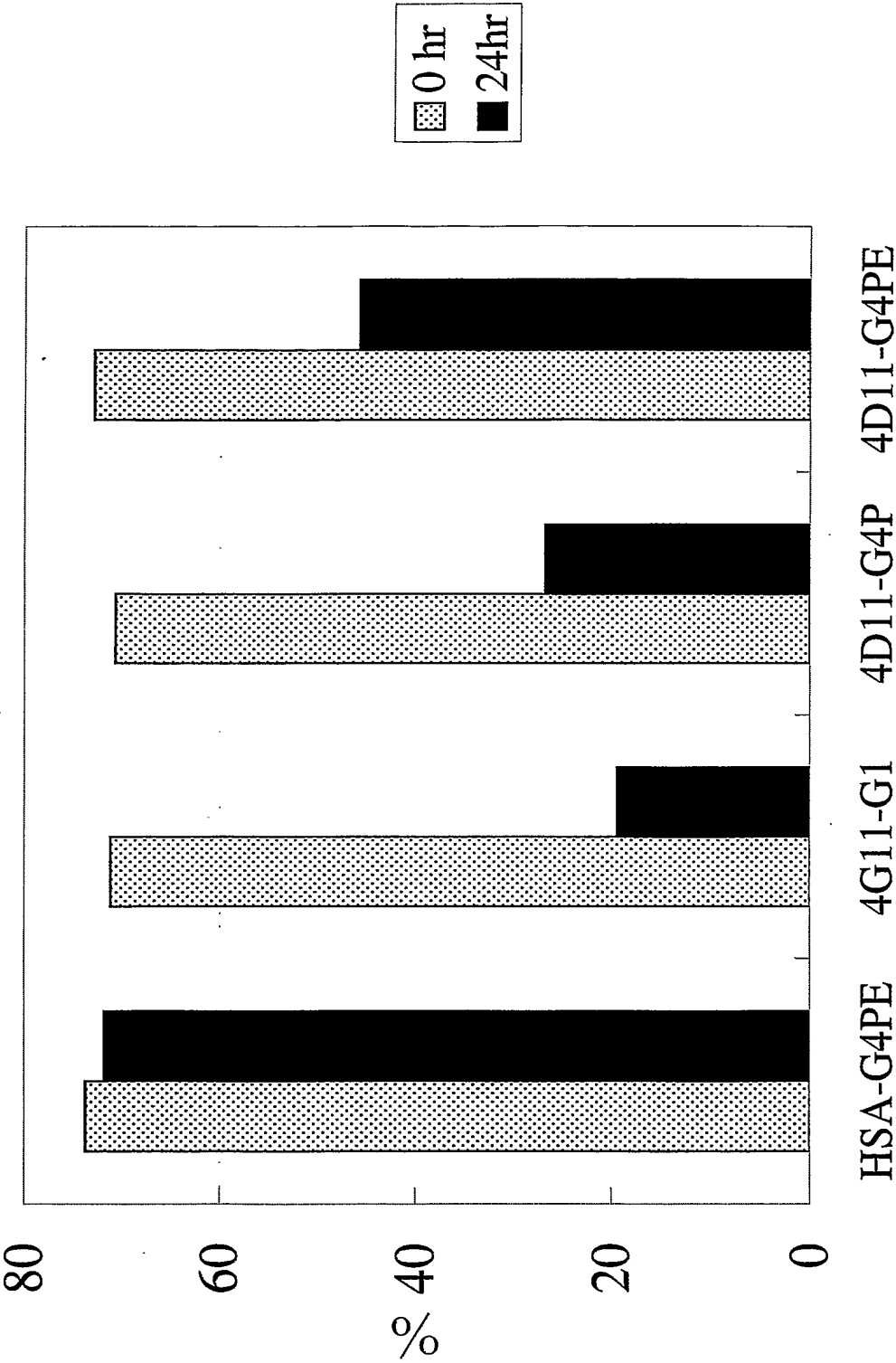


図 1 2 A

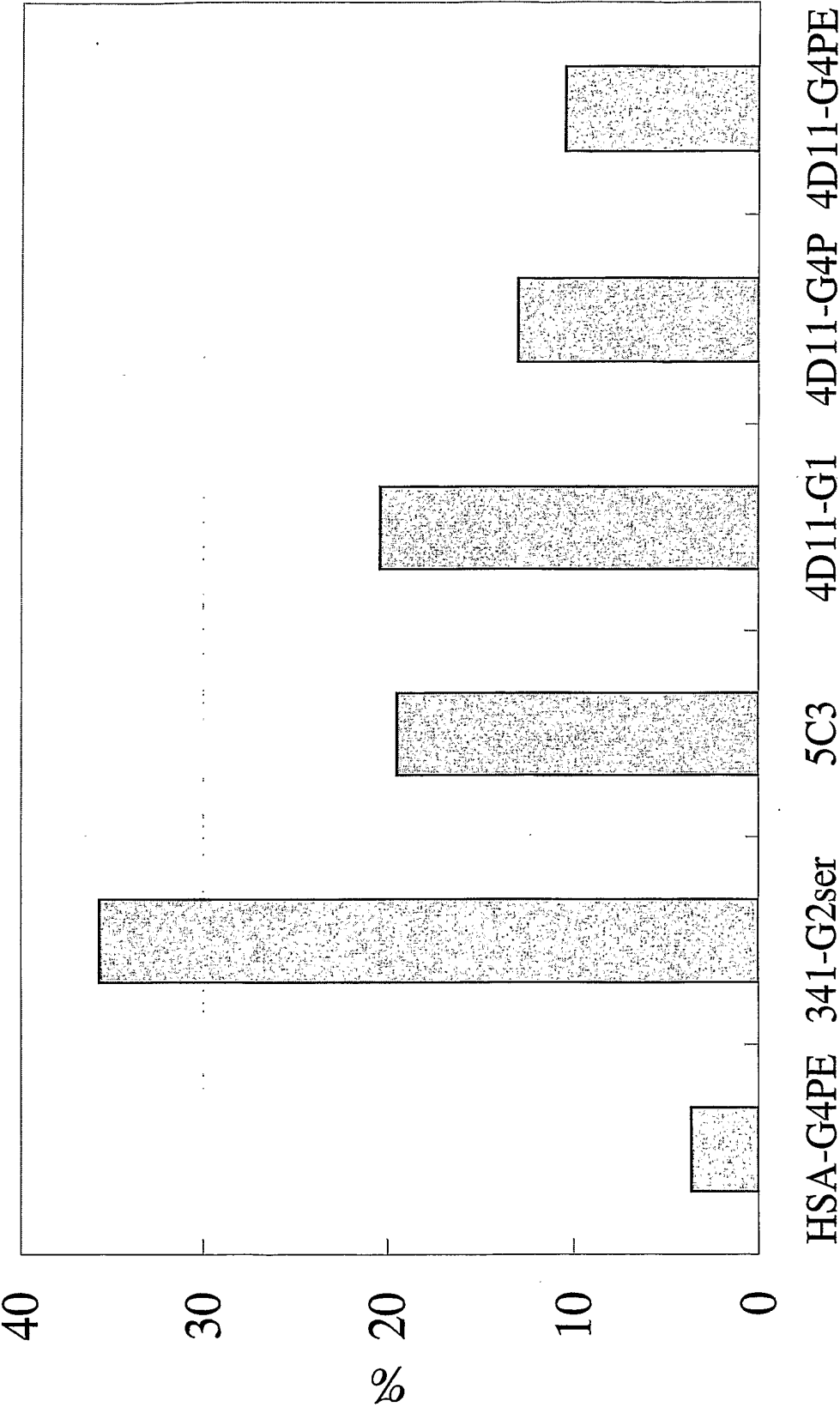


図 12B

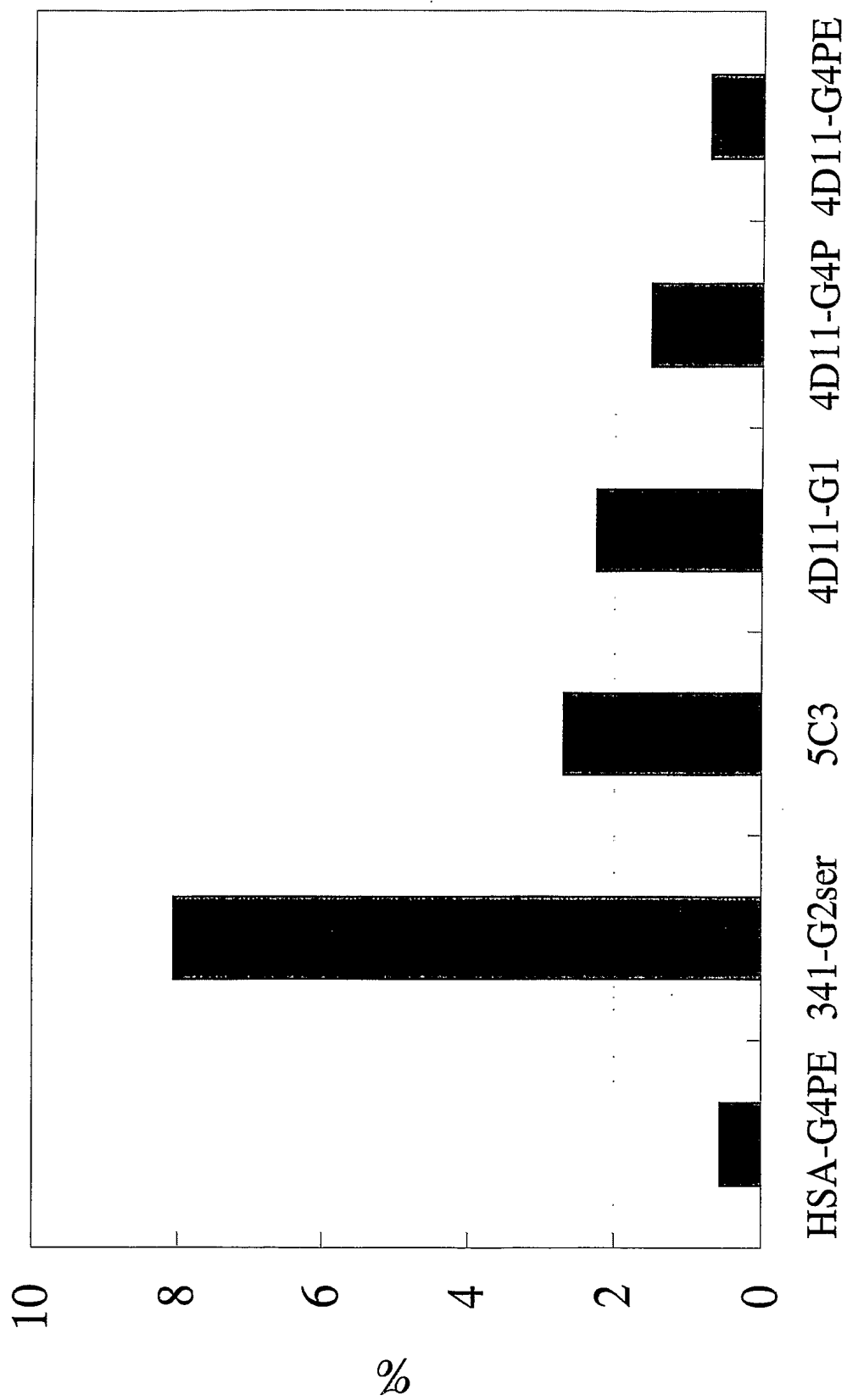


図 12C

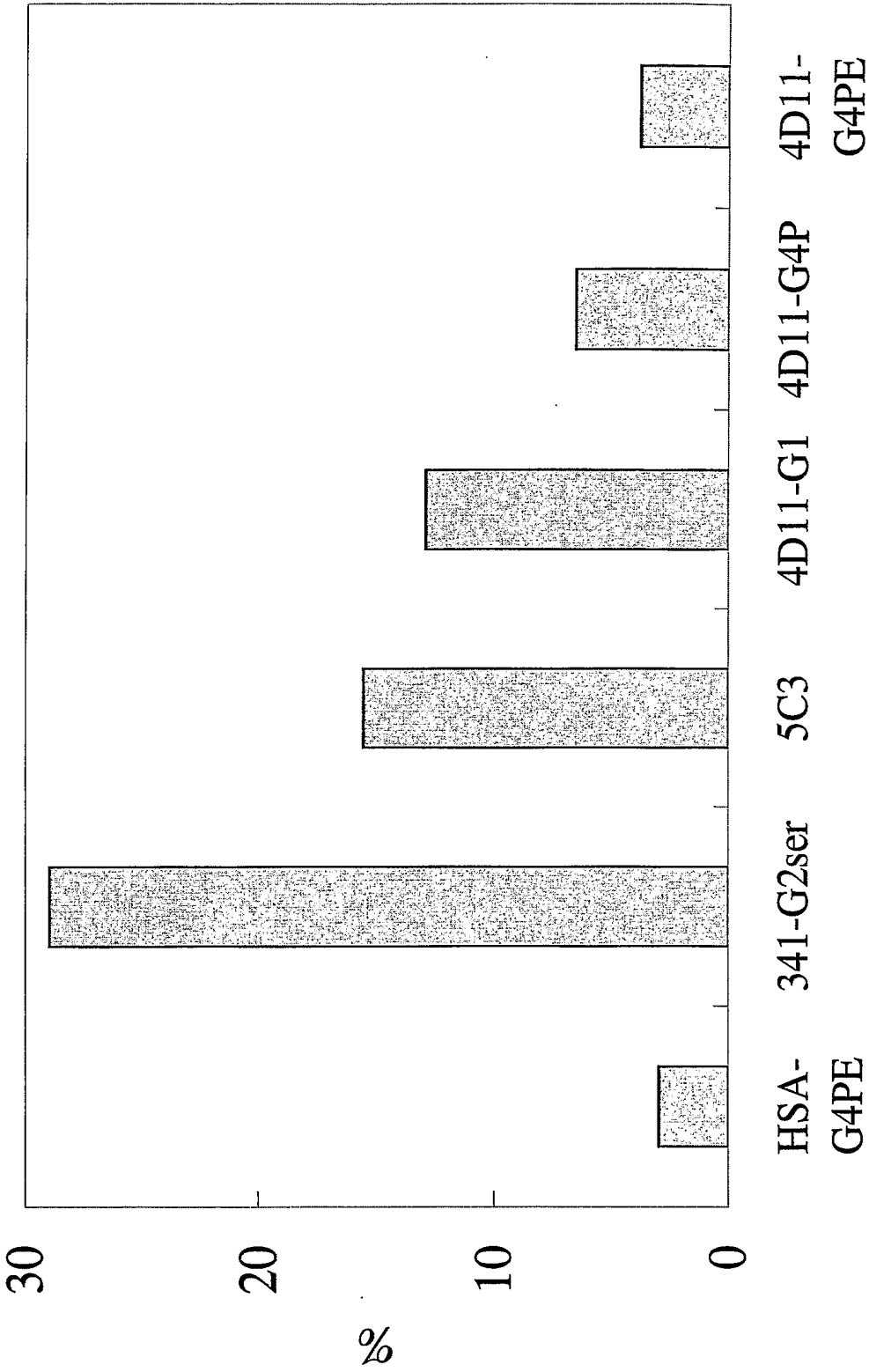


図 13 A

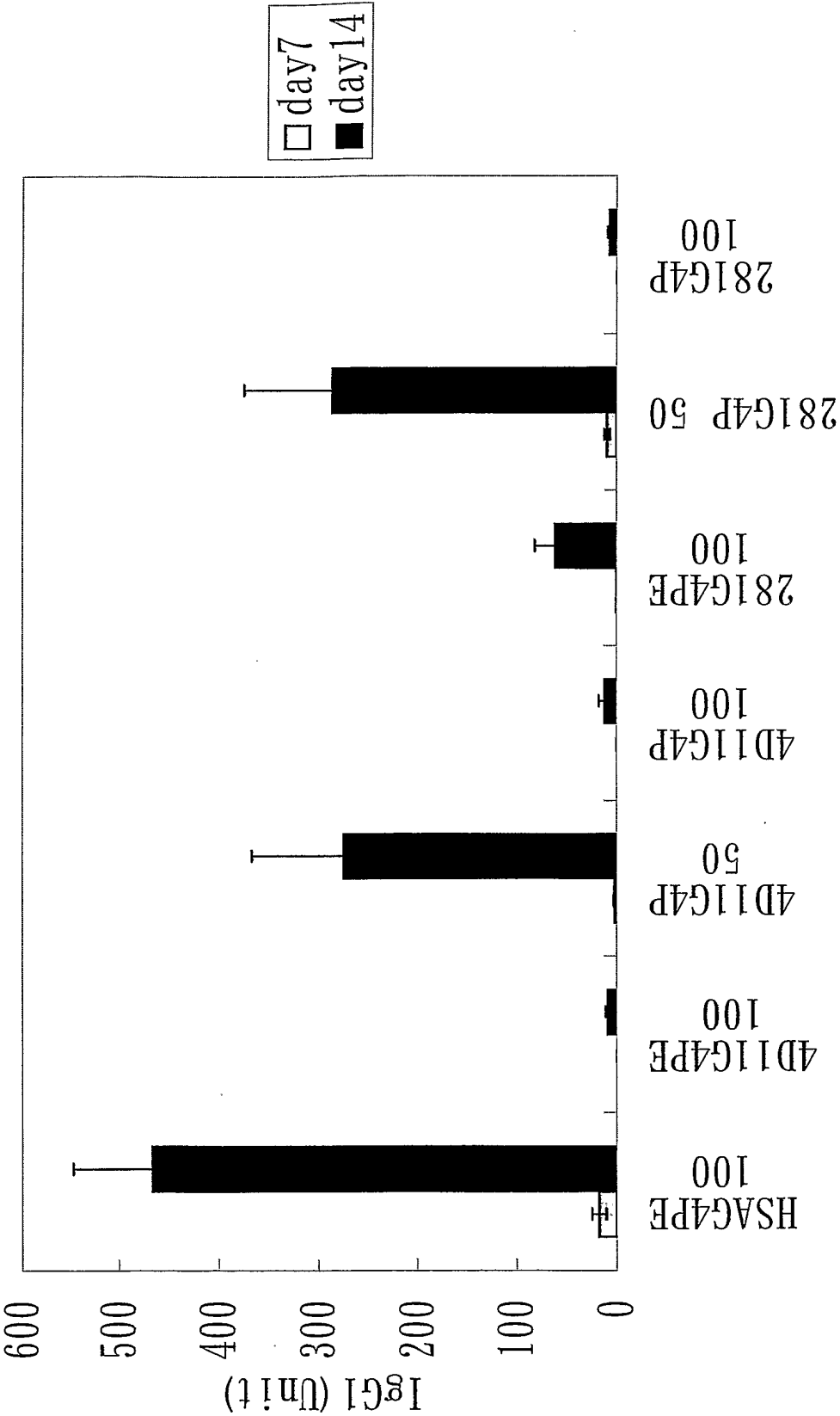


図 13 B

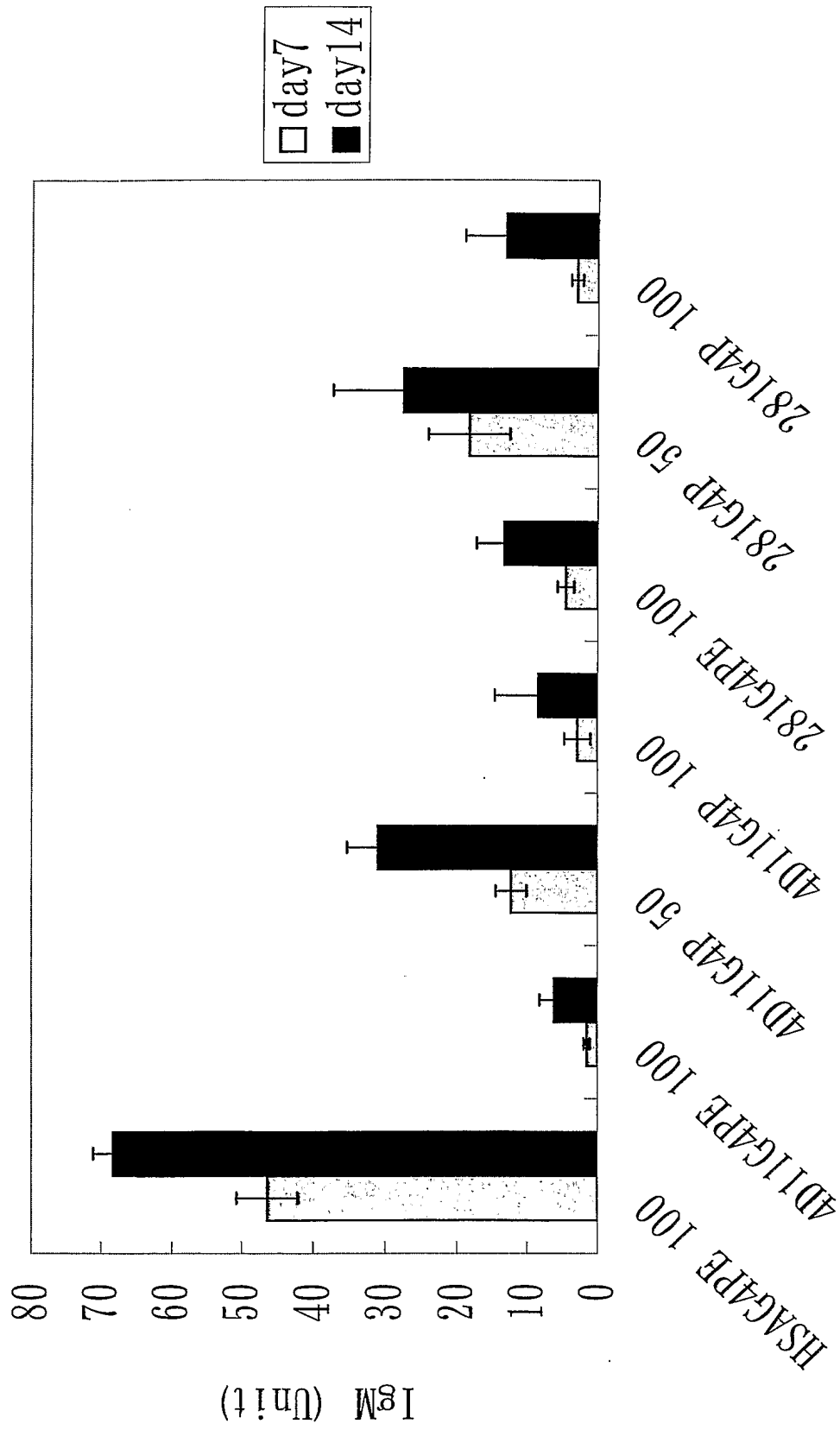


図 14 A

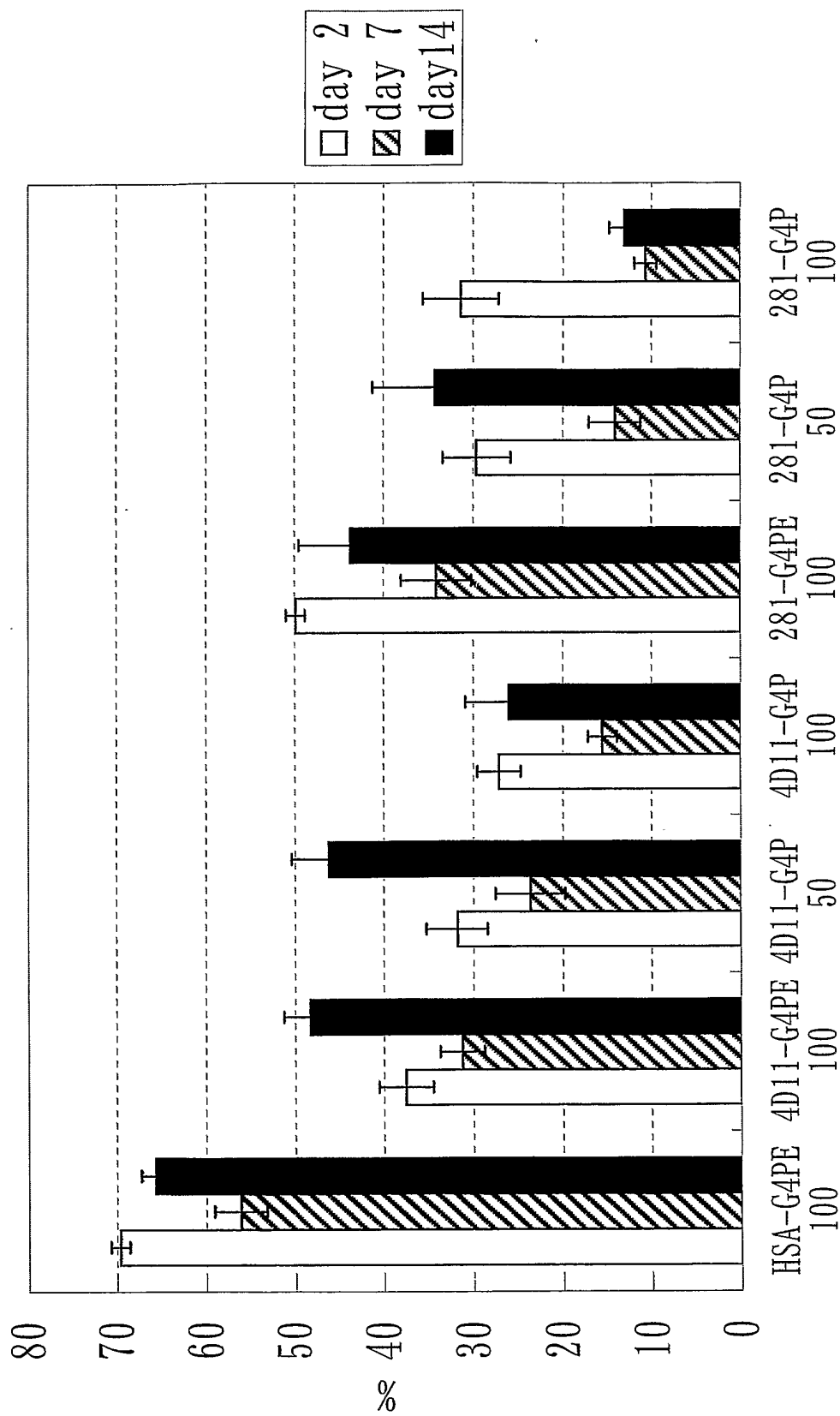


図 1 4 B

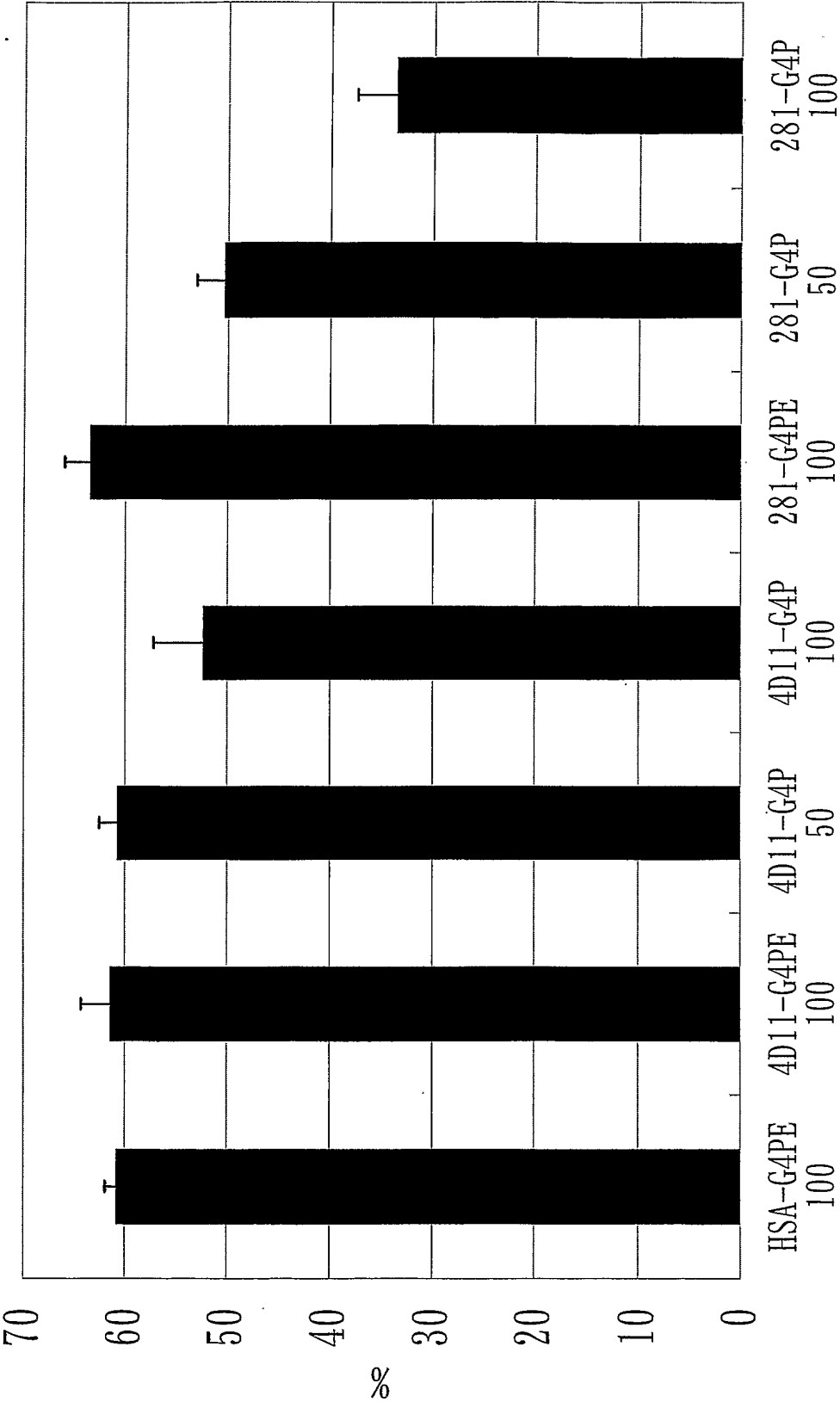


図 15

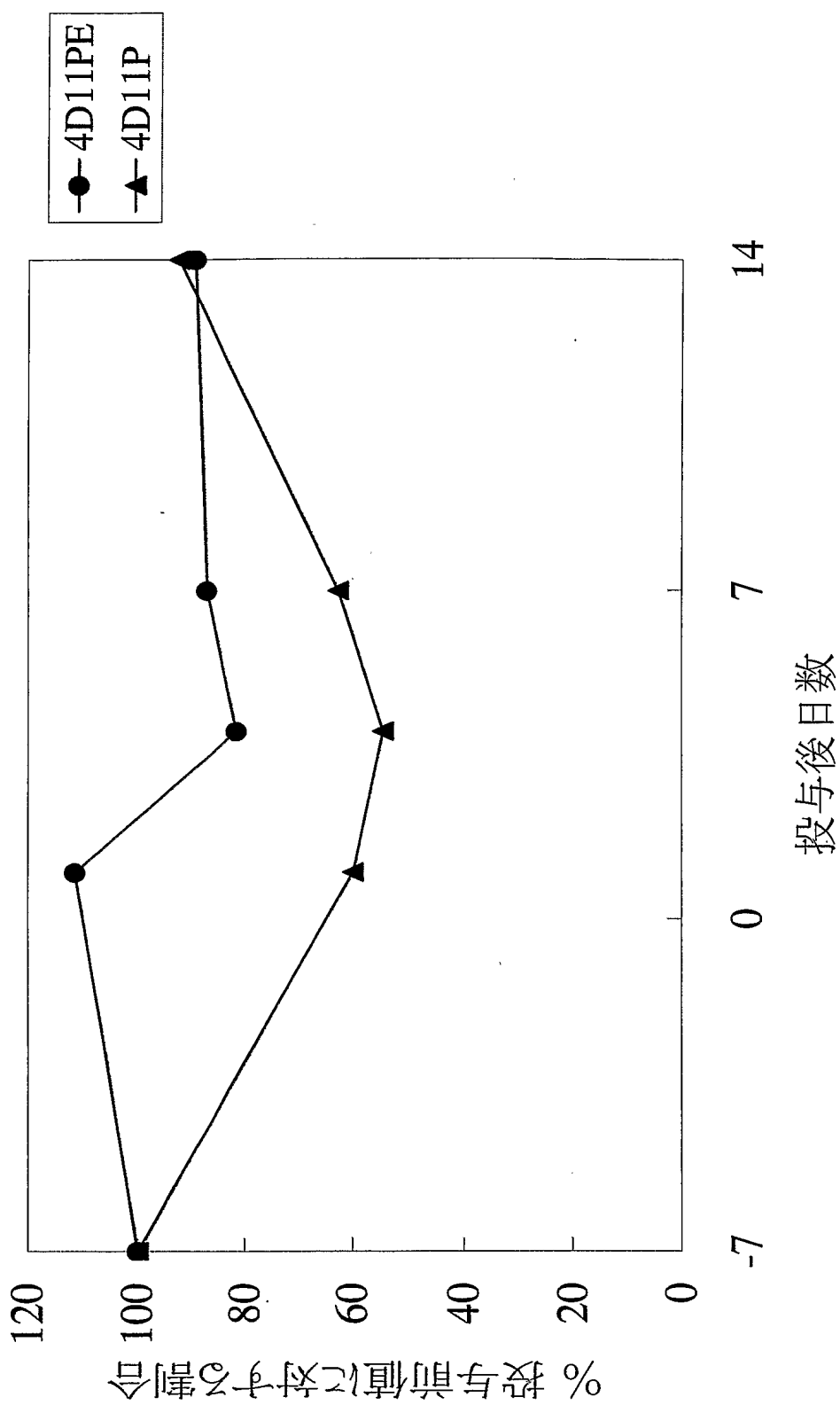
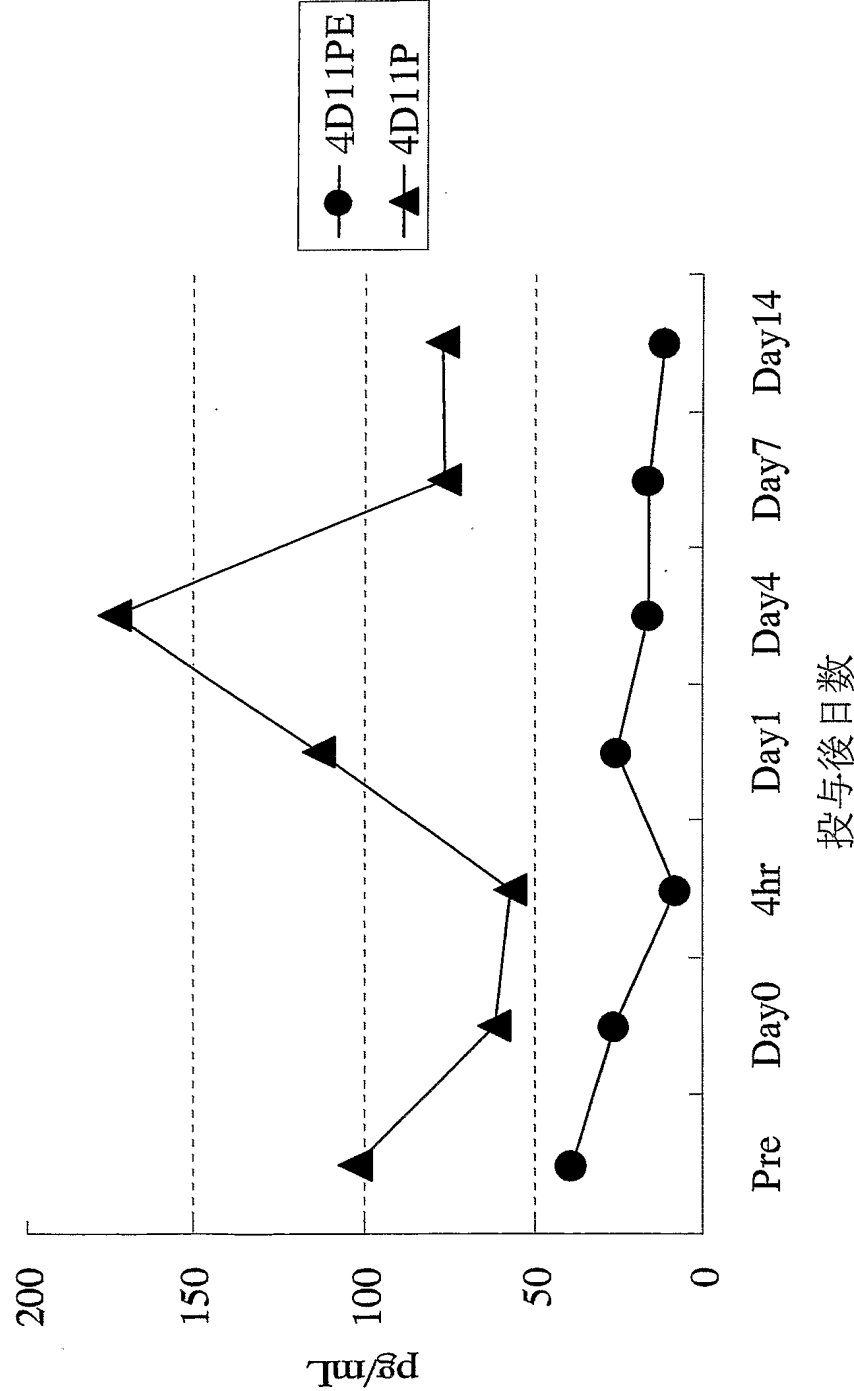


図 16



17

処置		平均スコア*		
群	感受	腹部皮内 チャレンジ	24時間**	48時間**
(mg/kg)	背部皮内	筋肉内		
デタヌス毒素				
対照	10 µL/部位	0 Lf/mL	0.00	0.00
	x	1 Lf/mL	1.67	1.00
	12 部位	3 Lf/mL	3.00	2.67
		10 Lf/mL	3.33	3.00
4D11 1 (mg/kg)	10 µL/部位	0 Lf/mL	0.00	0.00
	x	1 Lf/mL	0.67	0.67
	12 部位	3 Lf/mL	1.00	0.67
		10 Lf/mL	1.00	1.00
4D11 10 (mg/kg)	10 µL/部位	0 Lf/mL	0.00	0.00
	x	1 Lf/mL	0.00	0.00
	12 部位	3 Lf/mL	0.67	0.33
		10 Lf/mL	1.00	0.67
備考				
*: 反応スコア		浮腫の形成		
紅斑および痂皮の形成		浮腫なし		
紅斑なし		非常に軽度な浮腫 (かろうじて認識できる)		
非常に軽度な紅斑 (かろうじて認識できる)		軽度浮腫 (はつきりした膨隆による明確な縁が識別できる)		
はつきりした紅斑		中等度浮腫 (約1mmの膨隆)		
中度ないし高度紅斑		高度浮腫 (1mm以上の膨隆と暴露範囲を超えた広がり)		
高度紅斑からわずかな痂皮 (深部損傷) まで				
**: チャレンジ後時間				
		0		
		1		
		2		
		3		
		4		

図 18

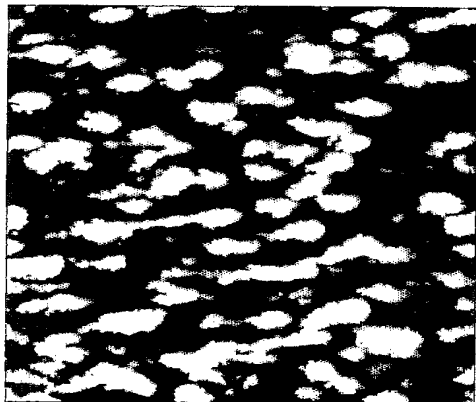
群		動物 No.	pre	初回投与後の日数							(最大陽性希釈倍率)			
				4	7	11	14	18	21	23				
対照	1	0	200	0	12800	102400	204800	204800	204800	204800	204800	204800		
	2	0	0	0	6400	25600	51200	51200	51200	51200	51200			
	3	0	0	0	6400	12800	25600	25600	25600	25600	25600			
	Mean	0	67	0	8533	46933	93867	93867	93867	93867	93867			
1 (mg/kg)	S.D.	0	115	0	3695	48460	96920	96920	96920	96920	96920			
	4	0	0	0	200	1600	12800	12800	12800	12800	12800			
	5	0	0	0	200	400	6400	6400	6400	6400	6400			
	6	0	0	0	400	3200	6400	6400	6400	6400	6400			
10 (mg/kg)	Mean	0	0	0	267	1733	8533	8533	8533	8533	8533			
	S.D.	0	0	0	115	1405	3695	3695	3695	3695	3695			
	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
10 (mg/kg)	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	Mean	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	S.D.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			

図 19

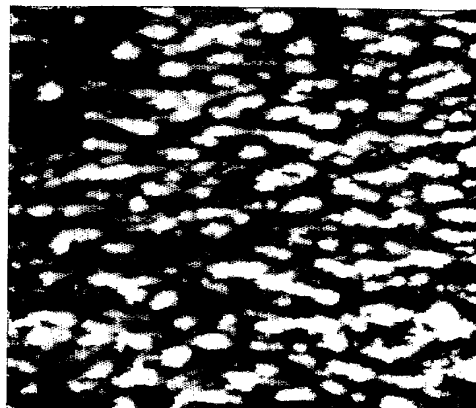
群	動物 No.	pre	初回投与後日数							(最大陽性希釈倍率)			
			4	7	11	14	18	21	23				
対照	1	0	0	0	3200	6400	6400	6400	6400				
	2	0	0	0	1600	1600	1600	1600	1600				
	3	0	0	0	800	1600	1600	1600	1600				
	Mean	0	0	0	1867	3200	3200	3200	3200				
	S.D.	0	0	0	1222	2771	2771	2771	2771				
1 (mg/kg)	4	0	0	0	0	0	400	0	0				
	5	0	0	0	0	0	0	0	0				
	6	0	0	0	0	800	800	800	800				
	Mean	0	0	0	0	267	400	267	267				
	S.D.	0	0	0	0	462	400	462	462				
10 (mg/kg)	7	0	0	0	0	0	0	0	0				
	8	0	0	0	0	0	0	0	0				
	9	0	0	0	0	0	0	0	0				
	Mean	0	0	0	0	0	0	0	0				
	S.D.	0	0	0	0	0	0	0	0				

図 2 0 A

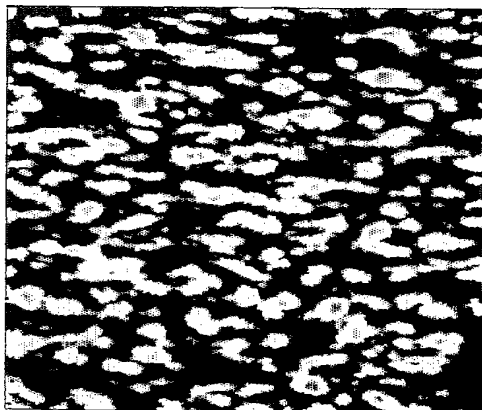
ヒトコントロールIgG4



抗CD40抗体 (4D11)



マウスコントロールIgG2



抗CD40L抗体 (5C8)

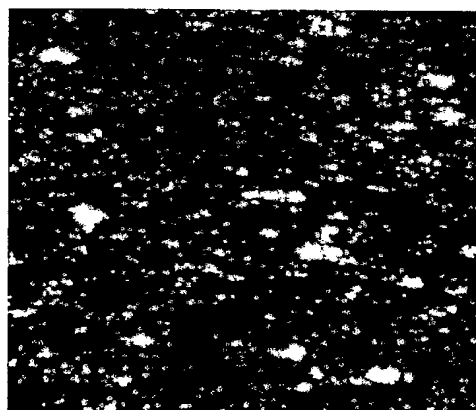


図 20 B

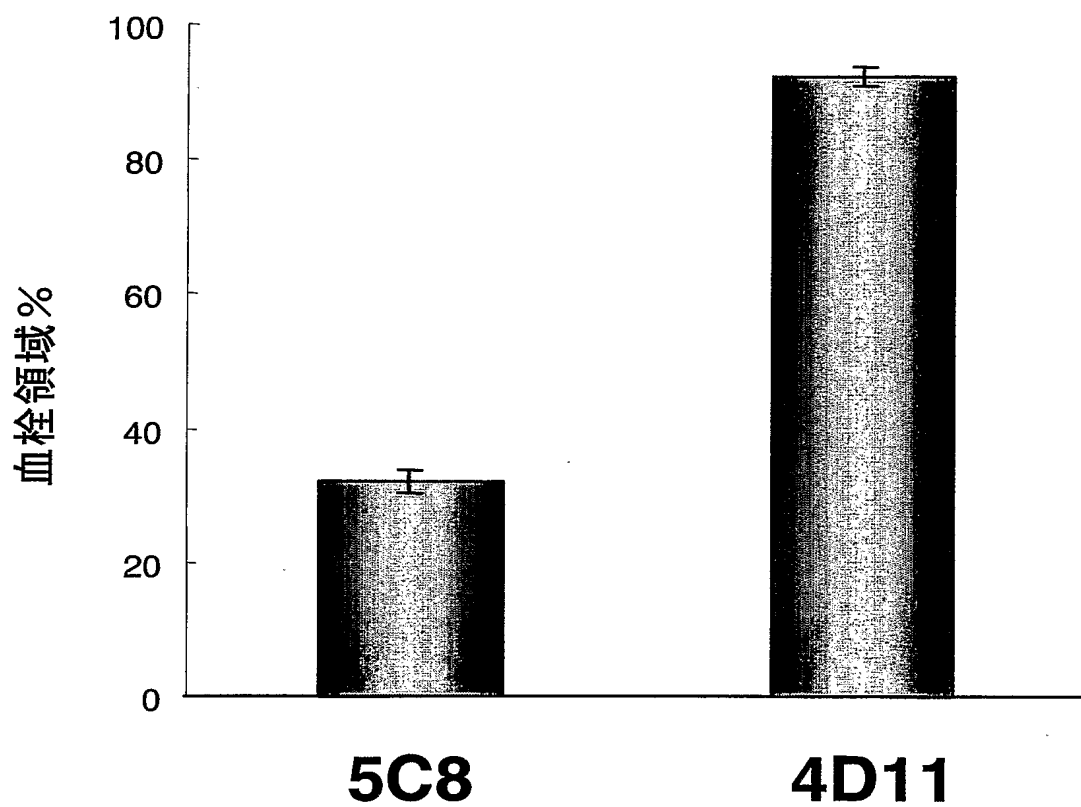


図21

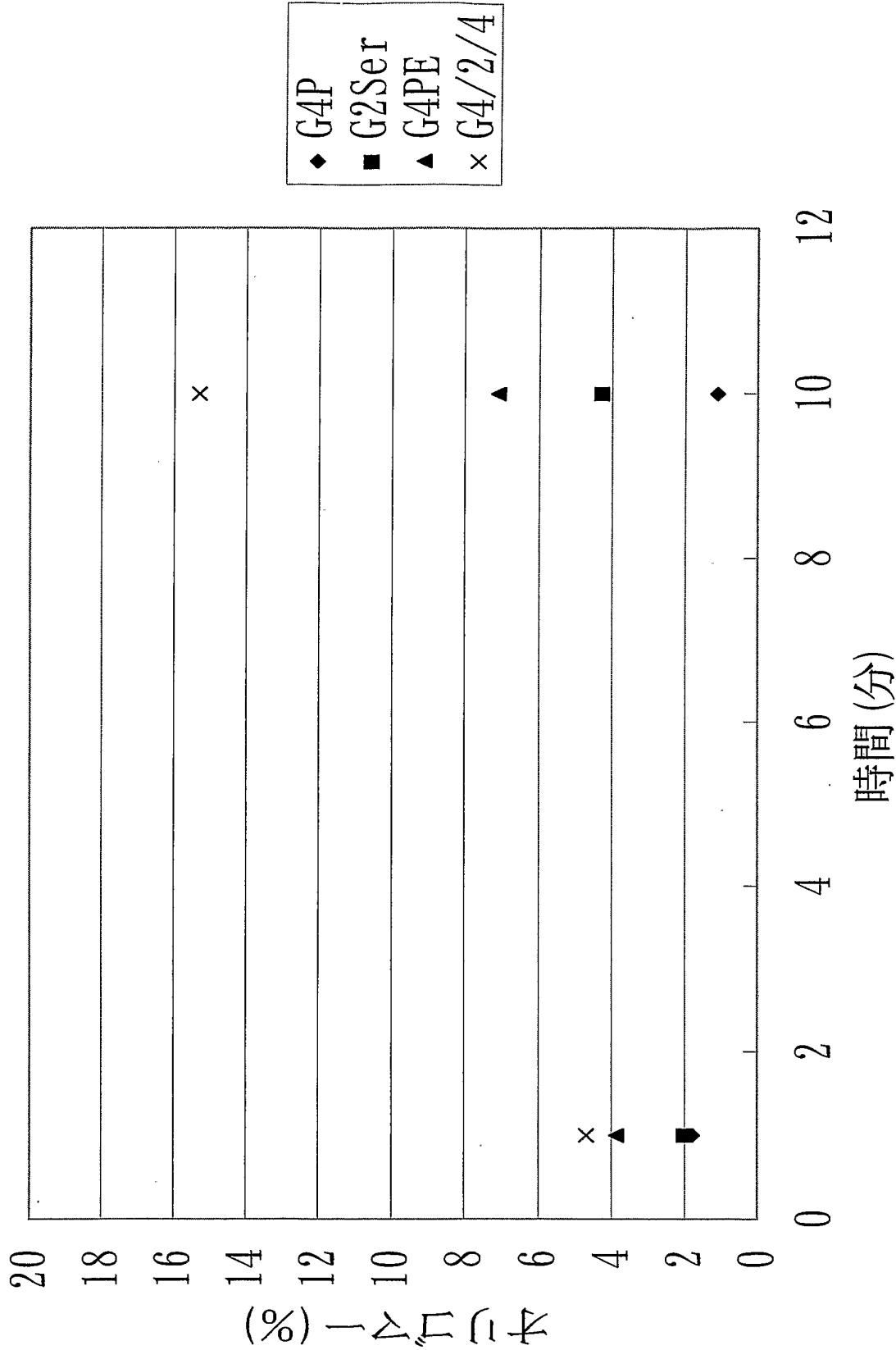


図 22

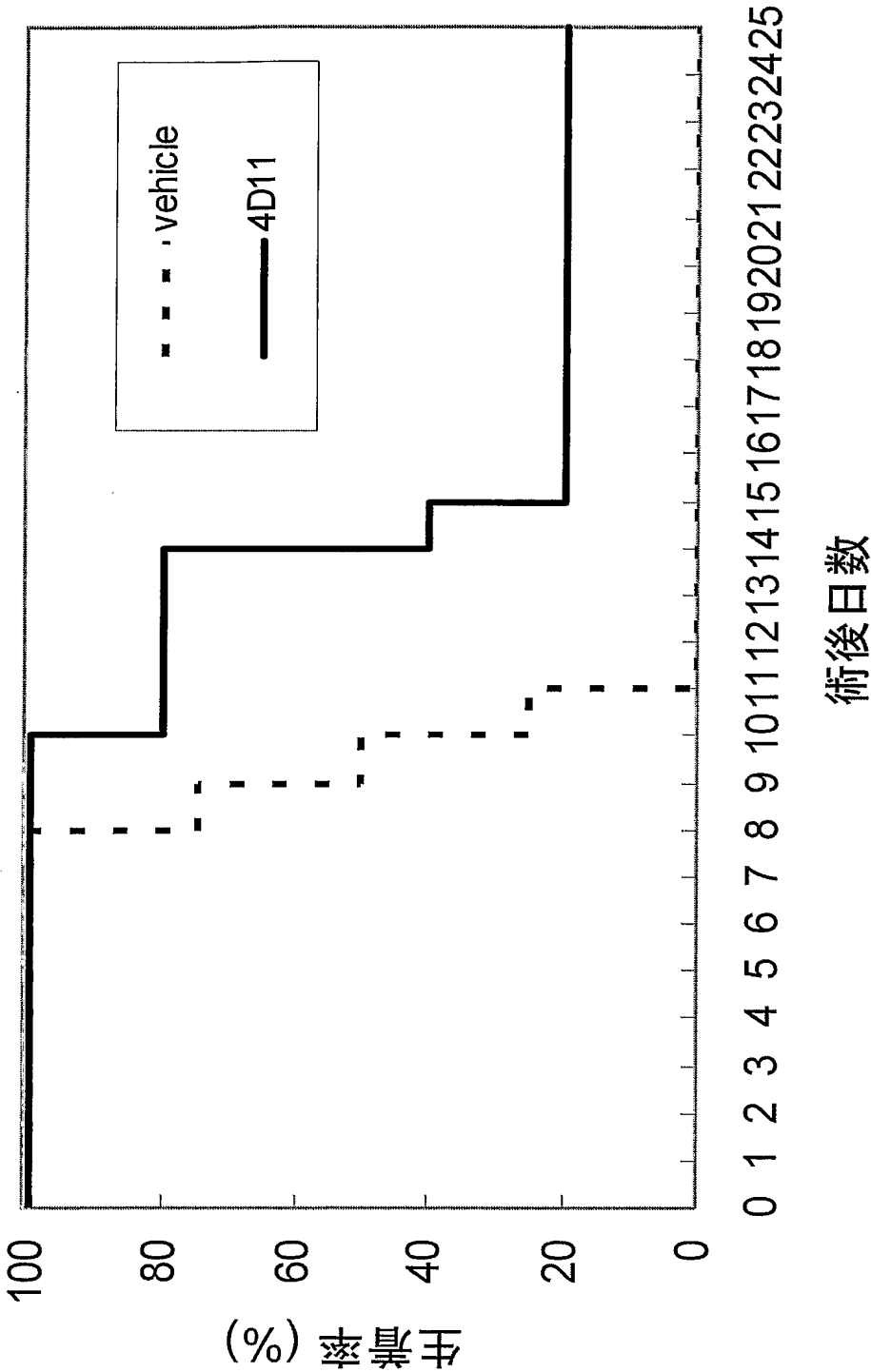


図 2 3

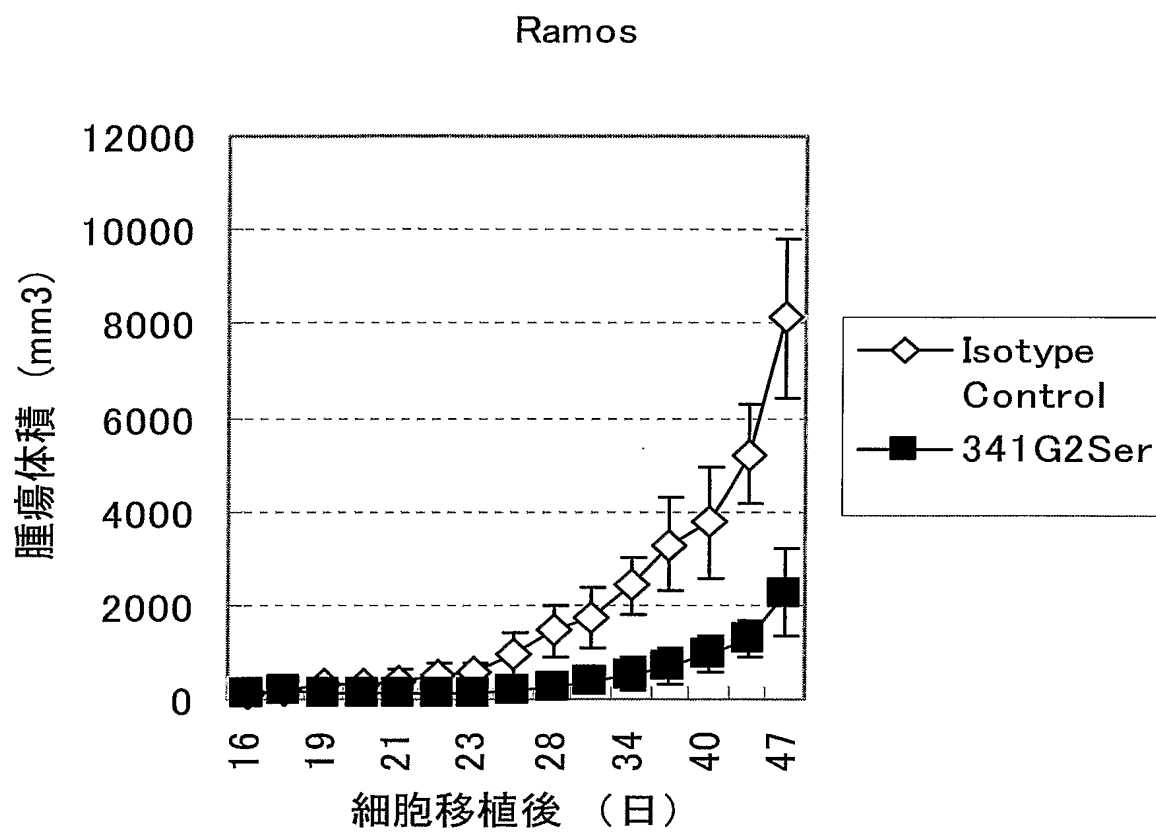


図 2 4

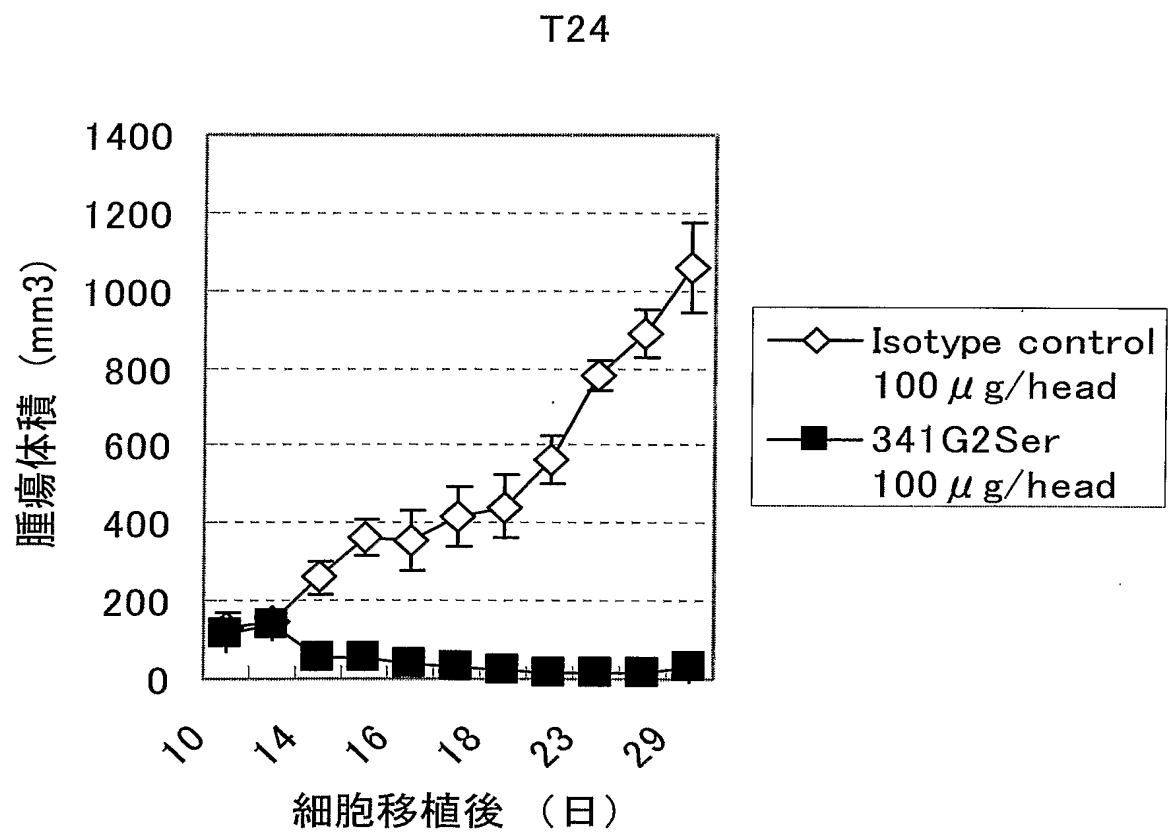


図 2 5

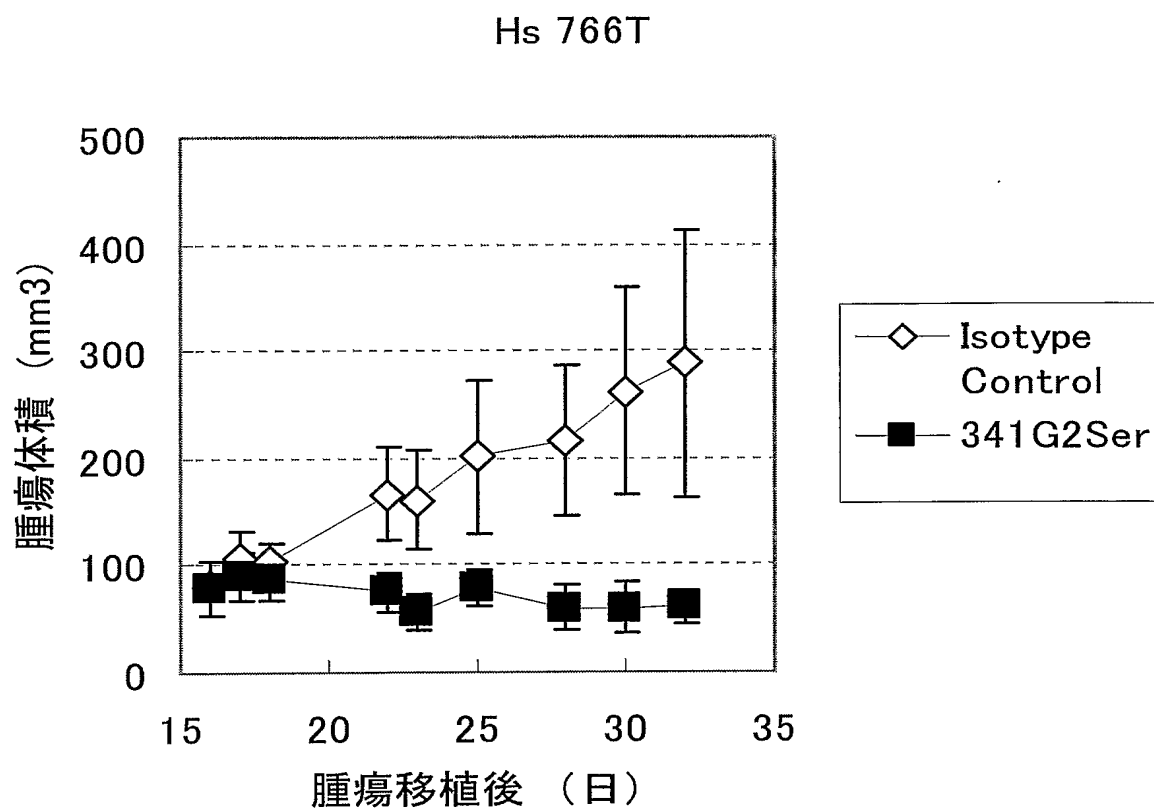
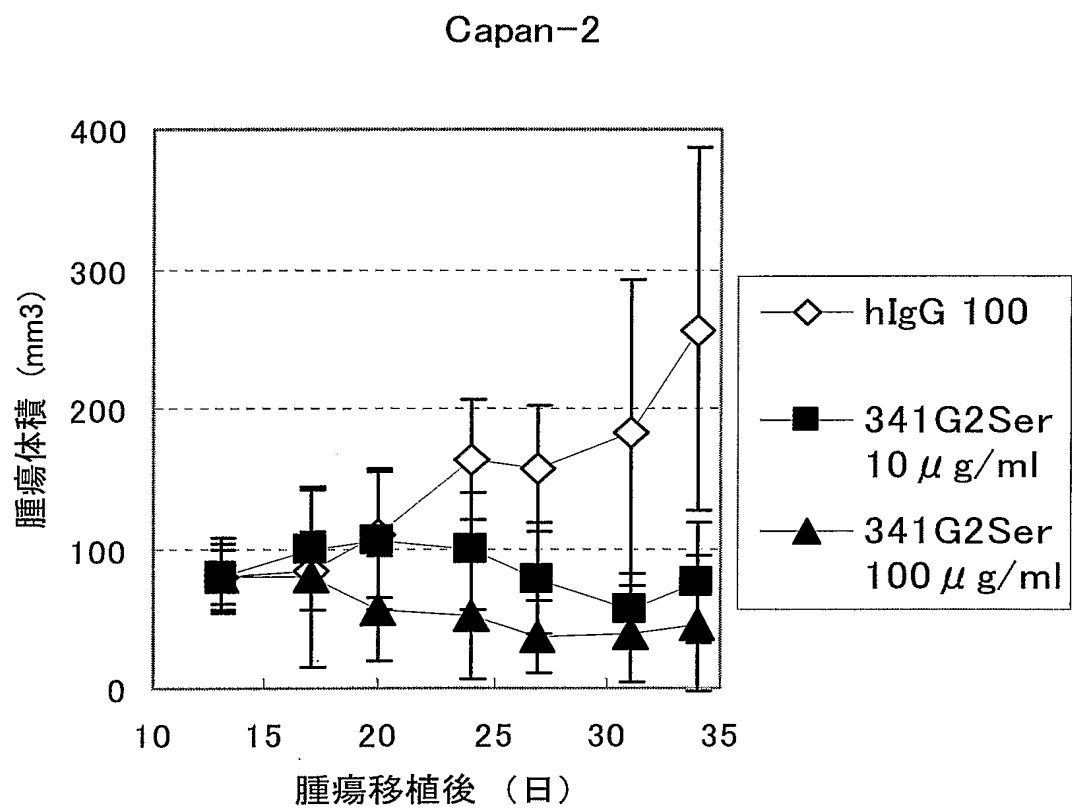


図 26



SEQUENCE LISTING

<110> KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA

<120> A mutant of anti CD40 antibody

<130> PH-2356-PCT

<140>

<141>

<150> JP 2003-431408

<151> 2003-12-25.

<160> 142

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 175

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu Ile Asn Ser Gln

1

5

10

15

Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys Thr

20

25

30

Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu Ser Glu Phe Leu
35 40 45

Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp
50 55 60

Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp
65 70 75 80

Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys
85 90 95

Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly Phe Gly Val Lys
100 105 110

Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu Pro Cys Pro Val
115 120 125

Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys Cys His Pro Trp
130 135 140

Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln Ala Gly Thr Asn
145 150 155 160

Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu Arg Ala Leu
165 170 175

<210> 2

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 2

atatgctagc accaagggcc catcggtctt ccccttggc

39

<210> 3

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 3

atatggatcc tcatttaccc ggagacaggg agaggctc

38

<210> 4

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 4

atatgctagc accaagggcc catcggctctt ccccctggcg

40

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 5

gttttctcga tggaggctgg gaggcc

26

<210> 6

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 6

atatggatcc tcatttaccc ggagacaggg agaggctc

38

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 7

ggcctcccag cctccatcga gaaaac

26

<210> 8

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 8

atatggatcc tcatttaccg ggagacaggg agaggc

36

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 9

aggggtccgg gagatcatga gagtgtcctt

30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 10

aaggacactc tcatgatctc ccggaccctt

30

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 11

tgatcatacg tagatatcac ggc

23

<210> 12

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 12

tgatcatacg tagatatcac ggc

23

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 13

gggtacgtcc tcacattcag tgatcag

27

<210> 14

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 14

tttgcgctca actgtcttgt ccaccttggt gttgctggg

39

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 15

tgatcatacg tagatatcac ggc

23

<210> 16

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 16

acagttgagc gcaaattgtg tgtcgagtgc ccaccg

36

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 17

gggtacgtcc tcacattcag tgatcag

27

<210> 18

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 18

ggtgttgctg ggcttggat ctacgttgca g

31

<210> 19

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 19

ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac c

31

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 20

tgatcatacg tagatatcac ggc

23

<210> 21

<211> 27

<212> DNA ..

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 21

gggtacgtcc tcacattcag tgatcag

27

<210> 22

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 22

ggtgttgctg ggcttgtgat ctacgttgca g

31

<210> 23

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 23

ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac c

31

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 24

tgatcatacg tagatatcac ggc

23

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 25

gggtacgtcc tcacattcac tgatcag

27

<210> 26

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 26

cacaacattt ggactcaact ctcttgtcca cc

32

<210> 27

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 27

ggtggacaag agagttgagt ccaaattgtg tg

32

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 28

tgatcatacg tagatatcac ggc

23

<210> 29

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 29

gggtacgtcc tcacattcag tgatcag

27

<210> 30

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 30

ggcacggtgg gcatggggga ccatatttgc gctc

34

<210> 31

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 31

gagcgcaa at atgtccccc atgccaccg tgcc

34

<210> 32

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 32

tgatcatacg tagatatcac ggc

23

<210> 33

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 33

gggtacgtcc tcacattcag tgatcag

27

<210> 34

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 34

gaagactgac ggtcccccca ggaactctgg tgctgggca

39

<210> 35

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 35

tgcccagcac cagagttcct ggggggaccg tcagtcttc

39

<210> 36

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 36

tgatcatacg tagatatcac ggc

23

<210> 37

<211> 1480

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

```

gtcgacgctg aattctggct gaccagggca gccaccagag ctccagacaa tgtctgtctc 60
cttcctcatc ttcctgcccc tgctgggcct cccatggggg gtctgtcac aggtccaact 120
gcagcagtca ggtccaggac tggngaagcc ctgcagacc ctctactca cctgtgccat 180
ctccggggac agtgtctcta gcaacagtgc tacttggaa tggatcaggc agtccccatc 240
gagagacctt gagggtctgg gaaggacata ctacaggacc aagtggatc gtgattatgt 300
aggatctgtg aaaagtcgaa taatcatcaa ccagacaca tccaacaacc agttctccct 360
gcagctgaac tctgtgactc ccgaggacac ggctatatat tactgtacaa gagcacagtg 420
gctgggaggg gattaccct actactacag tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt 480
cacgctctct tcagcctcca ccaaggcccc atcggctctc cccctgggcg cctgtctccag 540
gagcacctcc gagagcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc 600
ggtgacggtg tcgtggaact caggcgtctt gaccagcggc gtgcacacct tcccagctgt 660
cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcaactt 720
cggcaccag acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa 780
gacagttgag cgcaaatgtt gtgtcgagt cccaccgtgc ccagcaccac ctgtggcagg 840
accgtcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc 900
tgaggtcacg tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cccgaggtcc agttcaactg 960
gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccacgggagg agcagttcaa 1020
cagcacgttc cgtgtggtca gcgtcctcac cgttgtgcac caggactggc tgaacggcaa 1080
ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc 1140
caaaacaaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggagga 1200
gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat 1260
cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cacctcccat 1320
gctggactca gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg 1380
gcagcagggg aacgtcttct catgtccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac 1440
gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atgaggatcc 1480

```

<210> 38

<211> 474

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Met Ser Val Ser Phe Leu Ile Phe Leu Pro Val Leu Gly Leu Pro Trp

1 5 10 15

Gly Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val

20 25 30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser

35 40 45

Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser

50 55 60

Arg Asp Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr

65 70 75 80

Arg Asp Tyr Val Gly Ser Val Lys Ser Arg Ile Ile Ile Asn Pro Asp

85 90 95

Thr Ser Asn Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu

100 105 110

Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Ala Gln Trp Leu Gly Gly Asp

115 120 125

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
130 135 140

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
145 150 155 160

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
165 170 175

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
180 185 190

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
195 200 205

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe
210 215 220

Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
225 230 235 240

Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
245 250 255

Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
305 310 315 320

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
340 345 350

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
370 375 380

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
420 425 430

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

450

455

460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465

470

<210> 39

<211> 406

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 39

actgctcagt taggacccag agggaaccat ggaagcccca gtcagcttc tcttctcct 60
 gctactctgg ctcccagata ccaccggaga aattgtgttg acacagtctc cagccaccct 120
 gtctttgtct ccaggggaaa gagccaccct ctcctgcagg gccagtcaga gtgtagcag 180
 ctacttagcc tggtagcaac agaaacctgg ccaggctccc aggctcctca tctatgatgc 240
 atccaacagg gccactggca tcccagccag gttcagtggc agtgggtctg ggacagactt 300
 cactctcacc atcagcagcc tagagcctga agattttgca gtttattact gtcagcagcg 360
 tagcaacact ttcggccctg ggaccaaagt ggatatcaaa cgtacg 406

<210> 40

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45
Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60
Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110
Asn Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr
115 120 125

<210> 41

<211> 508

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

ctgaacacag acccgtcgac tcccaggtgt ttccattcag tgatcagcac tgaacacaga 60
 ggactcacca tggagttggg actgagctgg attttccttt tggctatttt aaaaggtgtc 120
 cagtgtgaag tgcagctggt ggagtctggg ggaggcttgg tacagcctgg cagggtccctg 180
 agactctcct gtgcagcctc tggattcacc tttgatgatt atgcatgca ctgggtccgg 240
 caagctccag ggaagggcct ggagtgggtc tcaggtatta gttggaatag tggtagcttg 300
 gtgcatgcgg actctgtgaa gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaactcc 360
 ctgtatctgc aaatgaacag tctgagagct gaggacacgg ccttgtatta ctgtgcaaga 420
 gataggctat ttcggggagt taggtactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 480
 gtcaccgtct cctcagctag caccaagg 508

<210> 42

<211> 146

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly

1

5

10

15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20

25

30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35

40

45

Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50

55

60

Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Val His Ala

65

70

75

80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn

85

90

95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu

100

105

110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Leu Phe Arg Gly Val Arg Tyr Tyr Gly

115

120

125

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser

130

135

140

Thr Lys

145

<210> 43

<211> 414

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

ctgctcagtt aggaccacaga gggaaccatg gaagccccag ctcagcttct cttcctcctg 60
ctactctggc tcccagatac caccggagaa attgtgttga cacagtctcc agccaccctg 120
tctttgtctc caggggaaag agccaccctc tctgcaggg ccagtcagag tgttagcagc 180
tacttagcct ggtaccaaca gaaacctggc caggctccca ggctcctcat ctatgatgca 240
tccaacaggg ccaactggcat cccagccagg ttcagtggca gtgggtcttg gacagacttc 300
actctacca tcagcagcct agagcctgaa gatittgcag tttattactg tcagcagcgt 360

agccactggc tcactttcgg cgggggggacc aaggtggaga tcaaacgtac ggtg 414

<210> 44

<211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser

35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser

100 105 110

His Trp Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr

115

120

125

Val

<210> 45

<211> 462

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

```

atatgtcgac gagtcatgga tctcatgtgc aagaaaatga agcacctgtg gttcttcctc 60
ctgctggtgg cggctcccag atgggtcctg tcccagctgc agctgcagga gtcgggcccc 120
ggactactga agccttcgga gaccctgtcc ctcacctgca ctgtctctgg cggctccatc 180
agcagtcctg gttactacgg gggctggatc cgccagcccc cagggaaggg gctggagtgg 240
attgggagta tctataaaag tgggagcacc taccacaacc cgtccctcaa gagtcgagtc 300
accatatccg tagacacgtc caagaaccag ttctccctga agctgagctc tgtgaccgcc 360
gcagacacgg ctgtgtatta ctgtacgaga cctgtagtac gatattttgg gtggttcgac 420
ccctggggcc agggaaccct ggtcacctgc tcctcagcta gc 462

```

<210> 46

<211> 149

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Met Asp Leu Met Cys Lys Lys Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu

1 5 10 15

Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu

 20 25 30

Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys

 35 40 45

Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Pro Gly Tyr Tyr Gly Gly Trp

 50 55 60

Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr

65 70 75 80

Lys Ser Gly Ser Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr

 85 90 95

Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser

 100 105 110

Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Pro Val Val

 115 120 125

Arg Tyr Phe Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

 130 135 140

Val Ser Ser Ala Ser

145

<210> 47

<211> 448

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 47

```

agatcttaag caagtgtaac aactcagagt acgcggggag acccactcag gacacagcat 60
ggacatgagg gtccccgctc agctcctggg gcttctgctg ctctggctcc caggtgccag 120
atgtgccatc cagttgacct agtctccatc ctccctgtct gcatctgtag gagacagagt 180
caccatcact tgccgggcaa gtcaggcat tagcagtgt ttagcctggt atcagcagaa 240
accagggaag gctcctaagc tcctgatcta tgatgcctcc aatttggaag gtgggggtccc 300
atcaagggtc agcggcagtg gatctgggac agatttcact ctcaccatca gcagcctgca 360
gcctgaagat ttgcaactt attactgtca acagtttaat agttaccga cgttcggcca 420
agggaccaag gtggaaatca aacgtacg                                     448

```

<210> 48

<211> 130

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

```

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
 1             5             10             15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser
                20             25             30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
 35             40             45

```

Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Phe Asn Ser Tyr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

Arg Thr
130

<210> 49

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 49

Glu Pro Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu Ile

1

5

10

<210> 50

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 50

Pro Thr Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu Ile Asn Ser

1

5

10

<210> 51

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 51

Ala Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu Ile Asn Ser Gln Cys

1

5

10

<210> 52

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 52

Arg Glu Lys Gln Tyr Leu Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser

1

5

10

<210> 53

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 53

Lys Gln Tyr Leu Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys

1

5

10

<210> 54

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 54

Tyr Leu Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro

1

5

10

<210> 55

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 55

Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln

1

5

10

<210> 56

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 56

Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu
1 5 10

<210> 57

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 57

Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser
1 5 10

<210> 58

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 58

Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys

1 5 10

<210> 59

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 59

Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys Thr Glu

1 5 10

<210> 60

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 60

Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr
1 5 10

<210> 61

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 61

Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr
1 5 10

<210> 62

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 62

Leu Val Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys

1

5

10

<210> 63

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 63

Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro

1

5

10

<210> 64

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 64

Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly

1

5

10

<210> 65

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 65

Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu Ser

1

5

10

<210> 66

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 66

Thr Glu Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu Ser Glu Phe

1

5

10

<210> 67

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 67

Thr Glu Cys Leu Pro Cys Gly Glu Ser Glu Phe Leu Asp

1 5 10

<210> 68

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 68

Cys Leu Pro Cys Gly Glu Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp

1 5 10

<210> 69

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 69

Pro Cys Gly Glu Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg

1 5 10

<210> 70

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 70

Gly Glu Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr

1 5 10

<210> 71

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 71

Ser Glu Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys
1 5 10

<210> 72

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 72

Phe Leu Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln
1 5 10

<210> 73

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 73

Asp Thr Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His Lys

1

5

10

<210> 74

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 74

Trp Asn Arg Glu Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys

1

5

10

<210> 75

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 75

Arg Glu Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp Pro
1 5 10

<210> 76

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 76

Thr His Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu
1 5 10

<210> 77

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 77

Cys His Gln His Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu

1

5

10

<210> 78

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 78

Gln His Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val

1

5

10

<210> 79

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 79

Lys Tyr Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln

1

5

10

<210> 80

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 80

Cys Asp Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly

1

5

10

<210> 81

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic.
peptide

<400> 81

Pro Asn Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser

1

5

10

<210> 82

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 82

Leu Gly Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr

1

5

10

<210> 83

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 83

Leu Arg Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp Thr

1

5

10

<210> 84

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 84

Val Gln Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys

1 5 10

<210> 85

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 85

Gln Lys Gly Thr Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys

1 5 10

<210> 86

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 86

Gly Thr Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu
1 5 10

<210> 87

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 87

Ser Glu Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp
1 5 10

<210> 88

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 88

Thr Asp Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys
1 5 10

<210> 89

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 89

Thr Ile Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser
1 5 10

<210> 90

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 90

Cys Thr Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala
1 5 10

<210> 91

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 91

Cys Glu Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys Glu
1 5 10

<210> 92

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 92

Glu Gly Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys

1

5

10

<210> 93

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 93

Trp His Cys Thr Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu

1

5

10

<210> 94

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 94

Cys Thr Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg

1 5 10

<210> 95

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 95

Ser Glu Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys

1 5 10

<210> 96

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 96

Ala Cys Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro

1 5 10

<210> 97

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 97

Glu Ser Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly Phe

1

5

10

<210> 98

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 98

Cys Val Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly Phe Gly Val

1

5

10

<210> 99

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 99

Leu His Arg Ser Cys Ser Pro Gly Phe Gly Val Lys Gln

1 5 10

<210> 100

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 100

Arg Ser Cys Ser Pro Gly Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala

1 5 10

<210> 101

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 101

Cys Ser Pro Gly Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly

1

5

10

<210> 102

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 102

Pro Gly Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser

1

5

10

<210> 103

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 103

Phe Gly Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr

1 5 10

<210> 104

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 104

Val Lys Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys

1 5 10

<210> 105

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 105

Gln Ile Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu Pro
1 5 10

<210> 106

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 106

Ala Thr Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 107

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 107

Gly Val Ser Asp Thr Ile Cys Glu Pro Cys Pro Val Gly

1 5 10

<210> 108

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 108

Ser Asp Thr Ile Cys Glu Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe

1 5 10

<210> 109

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 109

Thr Ile Cys Glu Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn

1 5 10

<210> 110

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 110

Cys Glu Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser

1 5 10

<210> 111

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 111

Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala

1 5 10

<210> 112

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 112

Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu

1 5 10

<210> 113

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 113

Gly Phe Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys Cys

1 5 10

<210> 114

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 114

Phe Ser Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys Cys His Pro

1

5

10

<210> 115

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 115

Asn Val Ser Ser Ala Phe Glu Lys Cys His Pro Trp Thr

1

5

10

<210> 116

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 116

Ser Ser Ala Phe Glu Lys Cys His Pro Trp Thr Ser Cys
1 5 10

<210> 117

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 117

Ala Phe Glu Lys Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr
1 5 10

<210> 118

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 118

Glu Lys Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp

1

5

10

<210> 119

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 119

Cys His Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val

1

5

10

<210> 120

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 120

Pro Trp Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln
1 5 10

<210> 121

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 121

Thr Ser Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln Ala
1 5 10

<210> 122

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 122

Cys Glu Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln Ala Gly Thr

1

5

10

<210> 123

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 123

Thr Lys Asp Leu Val Val Gln Gln Ala Gly Thr Asn Lys

1

5

10

<210> 124

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 124

Asp Leu Val Val Gln Gln Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp

1

5

10

<210> 125

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 125

Val Val Gln Gln Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val

1

5

10

<210> 126

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 126

Gln Gln Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly

1

5

10

<210> 127

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 127

Ala Gly Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln

1 5 10

<210> 128

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 128

Thr Asn Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg

1 5 10

<210> 129

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 129

Lys Thr Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu Arg

1

5

10

<210> 130

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic
peptide

<400> 130

Asp Val Val Cys Gly Pro Gln Asp Arg Leu Arg Ala Leu

1

5

10

<210> 131

<211> 1425

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 131

```

atgtctgtct ccttcctcat cttcctgccc gtgctgggcc tcccatgggg tgtcctgtca 60
caggtccaac tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgagac cctctcactc 120
acctgtgcc a tctccgggga cagtgtctct agcaacagtg ctacttgga ctggatcagg 180
cagtcccat cgagagacct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggat 240
cgtgattatg taggatctgt gaaaagtoga ataatcatca acccagacac atccaacaac 300
cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctatata ttactgtaca 360
agagcacagt ggctgggagg ggattacccc tactactaca gtatggacgt ctggggccaa 420
gggaccacgg tcaccgtctc ctcagctagc accaagggcc catcggtctt cccctggcg 480
ccctgctcca ggagcacctc cgagagcaca gggccctgg gctgcctgg caaggactac 540
ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac tcaggcgctc tgaccagcgg cgtgcacacc 600
ttcccagctg tcctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc 660
tccagcaact tcggcaccca gacctacacc tgcaacgtag atcacaagcc cagcaacacc 720
aaggtggaca agacagttga gcgcaaagt tgtgtcgagt gccaccgtg cccagcacca 780
cctgtggcag gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaac ccaaggacac cctcatgatc 840
tcccggaacc ctgaggtcac gtgcgtgggt gtggacgtga gccacgaaga cccgaggtc 900
cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccacgggag 960
gagcagttca acagcacgtt ccgtgtggtc agcgtcctca ccgttgtgca ccaggactgg 1020
ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag gcctcccagc ctccatcgag 1080
aaaaccatct ccaaaaccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 1140
tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggcttctac 1200
cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1260
acacctccca tgctggactc cgacggctcc ttcttctct acagcaagct caccgtggac 1320
aagagcaggt ggcagcagg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1380
aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatga 1425

```

<210> 132

<211> 474

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 132

Met Ser Val Ser Phe Leu Ile Phe Leu Pro Val Leu Gly Leu Pro Trp

1

5

10

15

Gly Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val

20

25

30

Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser

35

40

45

Val Ser Ser Asn Ser Ala Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser

50

55

60

Arg Asp Leu Glu Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr

65

70

75

80

Arg Asp Tyr Val Gly Ser Val Lys Ser Arg Ile Ile Ile Asn Pro Asp

85

90

95

Thr Ser Asn Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu

100

105

110

Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Ala Gln Trp Leu Gly Gly Asp

115

120

125

Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
130 135 140

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
145 150 155 160

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
165 170 175

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
180 185 190

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
195 200 205

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe
210 215 220

Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
225 230 235 240

Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
245 250 255

Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
305 310 315 320

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
340 345 350

Lys Gly Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
370 375 380

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
420 425 430

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

450

455

460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

465

470

<210> 133

<211> 696

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 133

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaatttgtg tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
aggttcagtg gcagtggttc tgggacagac ttcaactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaaca ctttcggccc tgggacaaa 360
gtggatatca aacgtacggt ggctgcacca tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag 420
cagttgaaat ctggaactgc ctctgttggtg tgccctgctga ataacttcta tcccagagag 480
gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc ctccaatcgg gtaactcca ggagagtgtc 540
acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca gcacctgac gctgagcaaa 600
gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgccaagtca cccatcaggg cctgagctcg 660
cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag tgttga 696

<210> 134

<211> 231

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 134

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser

35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro

50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala

65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser

100 105 110

Asn Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala

115 120 125

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

130 135 140

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 145 150 155 160

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 165 170 175

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 180 185 190

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 195 200 205

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 210 215 220

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 135

<211> 1407

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 135

atggagttgg gactgagctg gattttcctt ttggctatatt taaaaggtgt ccagtgtgaa 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gcaggtccct gagactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac ctttgatgat tatgccatgc actgggtccg gcaagctcca 180
 gggaagggcc tggagtgggt ctcagggtatt agttggaata gtggtagctt ggtgcatgcg 240

gactctgtga agggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc cctgtatctg 300
 caaatgaaca gtctgagagc tgaggacacg gccttgtatt actgtgcaag agataggcta 360
 tttcggggag ttaggtacta cggtatggac gtctggggcc aagggaacac ggtcaccgtc 420
 tcctcagcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc 480
 tccgagagca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540
 gtgtcgtgga actcaggcgc tctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccagc tgtcctacag 600
 tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcaa cttcggcacc 660
 cagacctaca cctgcaacgt agatcacaaag cccagcaaca ccaaggtgga caagacagtt 720
 gagcgcaaat gttgtgtcga gtgcccaccg tgcccagcac cacctgtggc aggaccgtca 780
 gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 840
 acgtgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg 900
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccacggg aggagcagtt caacagcacg 960
 ttccgtgtgg tcagcgtcct caccgttgtg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 1020
 aagtgaagg tctccaacaa aggcctccca gcctccatcg agaaaacat ctccaaaacc 1080
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 1140
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 1200
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacacctcc catgctggac 1260
 tccgacggct ccttcttctt ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1320
 gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cagcagaag 1380
 agcctctccc tgtctccggg taaatga 1407

<210> 136

<211> 468

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 136

Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys Gly

1

5

10

15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Val His Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg Leu Phe Arg Gly Val Arg Tyr Tyr Gly
115 120 125

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
130 135 140

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr
145 150 155 160

Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
165 170 175

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val

180

185

190

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser

195

200

205

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr

210

215

220

Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val

225

230

235

240

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val

245

250

255

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

260

265

270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

275

280

285

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

290

295

300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr

305

310

315

320

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn

325 330 335
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Ser
340 345 350
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415
Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
420 425 430
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460
Ser Pro Gly Lys
465

<210> 137

<211> 702

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 137

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
 ctctcctgca gggccagtca gagtggttagc agctacttag cctgggtacca acagaaacct 180
 ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagccact ggctcacttt cggcgggggg 360
 accaagggtg agatcaaacg tacggtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 420
 gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 480
 agagaggcca aagtacagtg gaagggtgat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 540
 agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 600
 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcacca tcagggcctg 660
 agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ga 702

<210> 138

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1

5

10

15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser

20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
100 105 110

His Trp Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr

180

185

190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His

195

200

205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val

210

215

220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225

230

<210> 139

<211> 1425

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 139

atggatctca tgtgcaagaa aatgaagcac ctgtggttct tctcctgct ggtggcggct 60
 ccagatggg tctgtccca gctgcagctg caggagtcgg gccaggact actgaagcct 120
 tcggagaccc tgtccctcac ctgcactgtc tctggcggct ccatcagcag tcttggttac 180
 tacgggggct ggatccgcca gccccaggg aaggggctgg agtggattgg gagtatctat 240
 aaaagtggga gcacctacca caaccgtcc ctcaagagtc gagtcaccat atccgtagac 300
 acgtccaaga accagttctc cctgaagctg agctctgtga ccgccgcaga cacggctgtg 360
 tattactgta cgagacctgt agtacgatat tttgggtggt tcgaccctg gggccaggga 420
 accctggtca cgtctctc agctagcacc aaggggccat cgtcttccc cctggcgccc 480
 tgctccagga gcacctcga gagcacagcc gccctgggct gcctggtcaa ggactacttc 540
 cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca ggccctga ccagcggcgt gcacaccttc 600
 ccggtgtcc tacagtctc aggactctac tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc 660
 agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc aacgtagatc acaagcccag caacaccaag 720

gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt ccccatgcc caccatgccc agcacctgag 780
 ttcgaggggg gaccatcagt cttcctgttc cccccaaac ccaaggacac tctcatgac 840
 tcccggaccc ctgaggtcac gtgcgtggtg gtggacgtga gccaggaaga ccccgaggtc 900
 cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 960
 gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 1020
 ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag 1080
 aaaaccatct ccaagccaa agggcagccc cgagagccac aggtgtacac cctgccccca 1140
 tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggtttctac 1200
 cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1260
 acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctct acagcaggct aaccgtggac 1320
 aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 1380
 aaccactaca cacagaagag cctctccctg tctctgggta aatga 1425

<210> 140

<211> 474

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

Met Asp Leu Met Cys Lys Lys Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu

1

5

10

15

Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Leu Gln Leu Gln Glu

20

25

30

Ser Gly Pro Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys

35

40

45

Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Pro Gly Tyr Tyr Gly Gly Trp

50 55 60
 Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ser Ile Tyr
 65 70 75 80
 Lys Ser Gly Ser Thr Tyr His Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr
 85 90 95
 Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser
 100 105 110
 Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Pro Val Val
 115 120 125
 Arg Tyr Phe Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 130 135 140
 Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 145 150 155 160
 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 165 170 175
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 180 185 190
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 195 200 205
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly

210 215 220

Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
225 230 235 240

Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys
245 250 255

Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
260 265 270

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
275 280 285

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
290 295 300

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
305 310 315 320

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
325 330 335

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
340 345 350

Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
355 360 365

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu
 370 375 380

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 385 390 395 400

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 405 410 415

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 420 425 430

Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn
 435 440 445

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 450 455 460

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 465 470

<210> 141

<211> 708

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 141

atggacatga gggccccgc tcagctcctg gggcttctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 agatgtgccca tccagttgac ccagttctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagacaga 120

gtcaccatca cttgccgggc aagtcagggc attagcagtg ctttagcctg gtatcagcag 180
 aaaccaggga aagctcctaa gtcctgatc tatgatgcct ccaatttgga aagtggggtc 240
 ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagcctg 300
 cagcctgaag attttgcaac ttattactgt caacagttta atagttaccc gacgttcggc 360
 caagggacca aggtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
 tatcccagag aggccaaagt acagtgggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 540
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 600
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 660
 ggcttgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggtga 708

<210> 142

<211> 235

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 142

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser

20 25 30

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser

35 40 45

Gln Gly Ile Ser Ser Ala Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Phe Asn Ser Tyr Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225

230

235

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019750

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/09, C07K16/28, C12P21/08, A61K39/395, A61P37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-90, C07K14/00-16/46, C12P21/00-08, A61K39/395, A61P37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS), EUROPAT (QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2002/088186 A1 (Kirin Brewery Co., Ltd.), 07 November, 2002 (07.11.02), & EP 1391464 A1 & US 2003/0059427 A1	1-50, 52-82, 84-92
Y	E. E. Idusogie, et al., Mapping of the Clq binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc, 2000, J.Immunol., 164(8), p.4178-84	1-50, 52, 89-92
Y	M. H. Tao, Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype- specific differences in complement activation, 1993, J.Exp.Med., 178(2), p.661-7	53-82, 84-88, 93, 94

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 March, 2005 (22.03.05)

Date of mailing of the international search report
05 April, 2005 (05.04.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019750

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	A. Morgan, et al., The N-terminal end of the CH2 domain of chimeric human IgG1 anti-HLA-DR is necessary for Clq, Fc gamma RI and Fc gamma RIIII binding, 1995, Immunology, 86(2), p.319-24	53-82,84-88, 93,94
Y	M. P. REDDY, et al., Elimination of Fc Receptor-Dependent Effector Functions of a Modified IgG4 Monoclonal Antibody to Human CD4, 2000, J.Immunol., 164, p.1925-33	53-82,84-88, 93,94
A	S. Angal, et al., A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody, 1993, Mol.Immunol, 30(1), p.105-8	1-50,52-82, 84-94
A	JP 2003-519470 A (SEATTLE GENETICS, INC.), 24 June, 2003 (24.06.03), & WO 2000/075348 A1	1-50,52-82, 84-94
A	Y. Xu, et al., Residue at position 331 in the IgG1 and IgG4 CH2 domains contributes to their differential ability to bind and activate complement, 1994, J.Biol.Chem., 269(5), p.3469-74	1-50,52-82, 84-94
A	M. H. Tao, et al., The differential ability of human IgG1 and IgG4 to activate complement is determined by the COOH-terminal sequence of the CH2 domain, 1991, J.Exp.Med., 173(4), p.1025-8	1-50,52-82, 84-94
A	E. E. Idusogie, et al., Engineered antibodies with increased activity to recruit complement, 2001, J.Immunol., 166(4), p.2571-5	1-50,52-82, 84-94
A	R. C. Aalberse, et al., IgG4 breaking the rules, 2002, Immunology, 105(1), pages 9 to 19	1-50,52-82, 84-94
A	R. Newman, et al., Modification of the Fc Region of a Primatized IgG Antibody to Human CD4 Retains Its Ability to Modulate CD4 Receptors but Does Not Deplete CD4+ T Cells in Chimpanzees, 2001, Clinical Immunology, 98(2), p.164-74	1-50,52-82, 84-94

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019750

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 51, 83

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The methods as set forth in these claims pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT (continued to extra sheet)

2. ☒ Claims Nos.: (see below)

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

No international search was made on parts of claims 1 to 50, 52 and 89 to 92 and parts of claims 53 to 82, 84 to 88, 93 and 94, since these claims are not clearly described or the inventions according to these claims are neither sufficiently supported by the description (continued to extra sheet)

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions as set forth in claims 1 to 52 and 89 to 92 relate to the deletion, substitution or addition of an amino acid in the constant region of an anti-CD40 monoclonal antibody having an agonistic activity, while the inventions as set forth in claims 53 to 88, 93 and 94 relate to the deletion, substitution or addition of an amino acid in the constant region of an anti-CD40 monoclonal antibody having an antagonistic activity. Although the deletion, substitution or addition of an amino acid in the both invention groups causes an increase or a decrease in ADCC and/or CDC in anti-CD40 monoclonal antibody, the amino acids to be mutated are not the same.
(continued to extra sheet)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/019750

Continuation of Box No.II-1 of continuation of first sheet(2)

and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet(2)

nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete. Reasons are as follows.

Claims 1 to 12, 17 to 20, 45 to 50 and 52

Concerning "the heavy chain of a monoclonal antibody" according to the above claims, one having the heavy chain variable region of KM341-1-19 antibody or 2105 antibody and the upper hinge and middle hinge of human IgG2 and a substitution of proline at the 331-position in the constant region into serine is exclusively presented in EXAMPLES, etc. as the heavy chain of a CD40-binding monoclonal antibody causing an increase or decrease in ADCC and/or CDC and having an agonistic activity. Concerning the heavy chain of an anti-CD40 monoclonal antibody having a variable region or the deletion, substitution or addition of an amino acid other than those presented in EXAMPLES, etc., it is unknown a heavy chain of what specific structure of CD40-binding antibody causes an increase or decrease in ADCC and/or CDC and has an agonistic activity and an excessively large amount of trials and errors are needed for a person skilled in the art to obtain such an anti-CD40 monoclonal antibody heavy chain. Thus, it does not appear that the above claims are clearly described. Furthermore, it is considered that the inventions according to the above claims are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on the inventions the claims of which are not clearly described and which are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete.

Claims 50 and 52

Concerning "a medicinal composition" according to the above claims, no pharmacological data proving that the composition is useful for pathogen or in preventing or treating autoimmune diseases can be found in EXAMPLES, etc. Thus, it is unknown whether or not the composition is usable as a medicine. Therefore, it is considered that the inventions according to the above claims are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on the inventions the claims of which are not clearly described and which are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete.

(continued to next sheet)

Claims 1 to 50, 52 and 89 to 92

Concerning "the heavy chain of a monoclonal antibody" according to the above claims, nothing but the heavy chain of a CD40-binding monoclonal antibody having an agonistic activity and causing a decrease in CDC is found out in EXAMPLES, etc. (i.e., none causing an increase or a decrease in ADCC or an increase in CDC is not presented). It is unknown a heavy chain of a monoclonal antibody of what specific structure causes an increase or a decrease in ADCC and a heavy chain of a monoclonal antibody of what specific structure causes an increase in CDC. An excessively large amount of trials and errors are needed for a person skilled in the art to obtain such an anti-CD40 monoclonal antibody heavy chain. Thus, it does not appear that the above claims are clearly described. Furthermore, it is considered that the inventions according to the above claims are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on the inventions the claims of which are not clearly described and which are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete.

Claims 53 to 66, 81, 82 and 84 to 88

Concerning "the heavy chain of a monoclonal antibody" according to the above claims, one having the variable region of 4D11 antibody and human IgG4 constant region, human IgG4 constant region having a substitution of serine at the 228-position into proline or serine at the 228-position into proline and a substitution of leucine at the 235-position into glutamic acid is exclusively presented in EXAMPLES, etc. as the heavy chain of a CD40-binding monoclonal antibody causing an increase or decrease in ADCC and/or CDC and having an antagonistic activity. Concerning the heavy chain of an anti-CD40 monoclonal antibody having a variable region or the deletion, substitution or addition of an amino acid other than those presented in EXAMPLES, etc., it is unknown a heavy chain of what specific structure of CD40-binding antibody causes an increase or decrease in ADCC and/or CDC and has an antagonistic activity and an excessively large amount of trials and errors are needed for a person skilled in the art to obtain such an anti-CD40 monoclonal antibody heavy chain. Thus, it does not appear that the above claims are clearly described. Furthermore, it is considered that the inventions according to the above claims are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on the inventions the claims of which are not clearly described and which are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete.

(continued to next sheet)

Claims 82 and 84

Concerning "a medicinal composition" according to the above claims, no pharmacological data proving that the composition is useful in preventing or treating autoimmune diseases, allergy or blood coagulation factor VIII inhibition syndrome can be found in EXAMPLES, etc. Thus, it is unknown whether or not the composition is usable as a medicine. Therefore, it is considered that the inventions according to the above claims are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on the inventions the claims of which are not clearly described and which are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete.

Claims 53 to 82, 84 to 88, 93 and 94

Concerning "the heavy chain of a monoclonal antibody" according to the above claims, nothing causing an increase in ADCC and/or CDC is found out in EXAMPLES, etc. It is unknown what specific structure the monoclonal antibody heavy chain has and an excessively large amount of trials and errors are needed for a person skilled in the art to obtain such an anti-CD40 monoclonal antibody heavy chain. Thus, it does not appear that the above claims are clearly described. Furthermore, it is considered that the inventions according to the above claims are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete for the inventions to be carried out by a person skilled in the art.

No search was made on the inventions the claims of which are not clearly described and which are neither sufficiently supported by the description nor disclosed therein in a manner sufficiently clear and complete.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Moreover, an effect of sustaining the agonistic activity is achieved by the mutation in one group while an effect of sustaining the antagonistic activity is achieved by the mutation in the other group. Namely, they differ from each other. Thus, the matter common to these invention groups resides in the deletion, substitution or addition of an amino acid in the constant region of an anti-CD40 monoclonal antibody. However, this point is publicly known as reported in, for example, the following documents (JP 2003-519470 A (SEATTLE GENETICS, INC.) 24 June, 2003 (24.06.03) & WO 2000/075348 A1).

Such being the case, the inventions according to claims 1 to 52 and 89 to 92 and the inventions according to claims 53 to 88, 93 and 94 are not considered as a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. Namely, there are two groups of inventions differing from each other.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/09, C07K 16/28, C12P 21/08, A61K 39/395, A61P 37/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N 15/00-90, C07K 14/00-16/46, C12P 21/00-08, A61K 39/395, A61P 37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JICSTファイル(JOIS), EUROPAT(QUESTEL), MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN),

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 2002/088186 A1 (麒麟麦酒株式会社) 2002. 11. 07 & EP 1391464 A1 & US 2003/0059427 A1	1-50, 52-82, 84-94
Y	E. E. Idusogie, et. al, Mapping of the Clq binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc, 2000, J Immunol, 164 (8), p.4178-84	1-50, 52, 89-92
Y	M. H. Tao, Structural features of human immunoglobulin G that determine isotype-specific differences in complement activation, 1993, J Exp Med, 178 (2), p.661-7	53-82, 84-88, 93, 94

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 03. 2005

国際調査報告の発送日

05. 4. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

阪野 誠司

4 N

9 2 8 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	A. Morgan, et. al, The N-terminal end of the CH2 domain of chimeric human IgG1 anti-HLA-DR is necessary for Clq, Fc gamma RI and Fc gamma RIII binding, 1995, Immunology, 86(2), p.319-24	53-82, 84-88, 93, 94
Y	M. P. REDDY, et. al, Elimination of Fc Receptor-Dependent Effector Functions of a Modified IgG4 Monoclonal Antibody to Human CD4, 2000, J Immunol, 164, p.1925-33	53-82, 84-88, 93, 94
A	S. Angal, et. al, A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody, 1993, Mol Immunol, 30(1), p.105-8	1-50, 52-82, 84-94
A	JP 2003-519470 A (SEATTLE GENETICS, INC.) 2003.06.24 & WO 2000/075348 A1	1-50, 52-82, 84-94
A	Y. Xu, et. al, Residue at position 331 in the IgG1 and IgG4 CH2 domains contributes to their differential ability to bind and activate complement, 1994, J Biol Chem, 269 (5), p.3469-74	1-50, 52-82, 84-94
A	M. H. Tao, et. al, The differential ability of human IgG1 and IgG4 to activate complement is determined by the COOH-terminal sequence of the CH2 domain, 1991, J Exp Med, 173(4), p.1025-8	1-50, 52-82, 84-94
A	E. E. Idusogie, et. al, Engineered antibodies with increased activity to recruit complement, 2001, J Immunol, 166(4), p.2571-5	1-50, 52-82, 84-94
A	R. C. Aalberse, et. al, IgG4 breaking the rules, 2002, Immunology, 105(1), p.9-19	1-50, 52-82, 84-94
A	R. Newman, et. al, Modification of the Fc Region of a Primatized IgG Antibody to Human CD4 Retains Its Ability to Modulate CD4 Receptors but Does Not Deplete CD4+ T Cells in Chimpanzees, 2001, Clinical Immunology, 98 (2), p.164-74	1-50, 52-82, 84-94

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 51, 83 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
上記請求の範囲に係る方法は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☒ 請求の範囲 (下記参照) は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
請求の範囲1-50, 52, 89-92の一部、並びに、請求の範囲53-82, 84-88, 93, 94の一部は、請求の範囲が明確に記載されていないか、または、該請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていないため、国際調査を行っていない。理由は特別ページを参照。
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-52, 89-92に記載された発明は、アゴニスト活性を有する抗CD40モノクローナル抗体の定常領域にアミノ酸の欠失、置換または付加するものであり、請求の範囲53-88, 93, 94に記載された発明は、アンタゴニスト活性を有する抗CD40モノクローナル抗体の定常領域にアミノ酸の欠失、置換または付加するものである。両発明におけるアミノ酸の欠失、置換または付加は、抗CD40モノクローナル抗体のADCC及び/またはCDCを増加または低減を生じさせるものであるが、変異するアミノ酸は共通せず、また、変異による効果については、一方はアゴニスト活性の維持するものであり、他方はアンタゴニスト活性を維持するものであり、両者は異なるものである。してみれば、両発明の共通事項は、抗CD40モノクローナル抗体の定常領域にアミノ酸の欠失、置換または付加することであるが、この点は、例えば、以下の文献に記載されているように公知である。 JP 2003-519470 A (SEATTLE GENETICS, INC.) 2003.06.24 & WO 2000/075348 A1

よって、請求の範囲1-52, 89-92に記載された発明と請求の範囲53-88, 93, 94に記載された発明とは、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、異なる2の発明からなる発明群であると認める。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

請求の範囲 1-12, 17-20, 45-50, 52

上記請求の範囲に係る「モノクローナル抗体の重鎖」について、実施例等で、ADCC及び/またはCDCの増加または低減を生じさせ、且つ、アゴニスト活性を有するCD40に結合するモノクローナル抗体の重鎖として示されているのは、KM341-1-19抗体または2105抗体の重鎖可変領域、ヒトIgG2のアップーヒンジ及びミドルヒンジを有し、定常領域の331位のプロリンがセリンに置換されたもののみである。これら実施例等で示された以外の可変領域、アミノ酸の欠失、置換または付加を有する抗CD40モノクローナル抗体の重鎖について、ADCC及び/またはCDCを増加または低減を生じさせ、且つ、アゴニスト活性を有するCD40に結合するものが具体的にどのような構造を有しているか不明であり、また、そのような抗CD40モノクローナル抗体の重鎖を得ることは、当業者に過度な試行錯誤を必要とするものである。したがって、上記請求の範囲は明確に記載されておらず、また、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

なお、請求の範囲が明確に記載されておらず、また、明細書に十分な裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、国際調査を行っていない。

請求の範囲 50, 52

上記請求の範囲に係る「医薬組成物」について、実施例等を見ても、病原体または自己免疫疾患の予防または治療に有用であることを確認する薬理データ等が示されておらず、医薬として使用することができるかどうか不明である。したがって、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に記載されていない。

なお、明細書に十分な裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、国際調査を行っていない。

請求の範囲 1-50, 52, 89-92

上記請求の範囲に係る「モノクローナル抗体の重鎖」について、実施例等を見ても、CDCの低減を生じさせるアゴニスト活性を有するCD40に結合するモノクローナル抗体の重鎖以外のもの、即ち、ADCCの増加または低減を生じさせるもの、並びに、CDCの増加を生じさせるものは示されていない。ADCCの増加または低減を生じさせるモノクローナル抗体の重鎖、並びに、CDCの増加を生じさせるモノクローナル抗体の重鎖が具体的にどのような構造を有しているか不明であり、また、そのような抗CD40モノクローナル抗体の重鎖を得ることは、当業者に過度な試行錯誤を必要とするものである。したがって、上記請求の範囲は明確に記載されておらず、また、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

なお、請求の範囲が明確に記載されておらず、また、明細書に十分な裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、国際調査を行っていない。

請求の範囲 53-66, 81, 82, 84-88

上記請求の範囲に係る「モノクローナル抗体の重鎖」について、実施例等で、ADCC及び/またはCDCの増加または低減を生じさせ、且つ、アンタゴニスト活性を有するCD40に結合するモノクローナル抗体の重鎖として示されているのは、4D11抗体の重鎖可変領域を有し、且つ、ヒトIgG4定常領域、228位のセリンがプロリンに置換されたヒトIgG4定常領域、または、228位のセリンがプロリンに置換され、235位のロイシンがグルタミン酸に置換されたヒトIgG4定常領域を有するもののみである。これら実施例等で示された以外の可変領域、アミノ酸の欠失、置換または付加を有する抗CD40モノクローナル抗体の重鎖について、ADCC及び/またはCDCを増加または低減を生じさせ、且つ、アンタゴニスト活性を有するCD40に結合するものが具体的にどのような構造を有しているか不明であり、また、そのような抗CD40モノクローナル抗体の重鎖を得ることは、当業者に過度な試行錯誤を必要とするものである。したがって、上記請求の範囲は明確に記載されておらず、また、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

なお、請求の範囲が明確に記載されておらず、また、明細書に十分な裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、国際調査を行っていない。

請求の範囲 82, 84

上記請求の範囲に係る「医薬組成物」について、実施例等を見ても、自己免疫疾患、アレルギーまたは血液凝固第Ⅷ因子阻害症候群の予防または治療に有用であることを確認する薬理データ等が示されておらず、医薬として使用することができるかどうか不明である。したがって、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施できる程度に明確かつ十分に記載されていない。

なお、明細書に十分な裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、国際調査を行っていない。

請求の範囲 53-82, 84-88, 93, 94

上記請求の範囲に係る「モノクローナル抗体の重鎖」について、実施例等を見ても、ADCC及び/またはCDCの増加を生じさせるものは示されていない。そのようなモノクローナル抗体の重鎖が具体的にどのような構造を有しているか不明であり、また、該抗CD40モノクローナル抗体の重鎖を得ることは、当業者に過度な試行錯誤を必要とするものである。したがって、上記請求の範囲は明確に記載されておらず、また、上記請求の範囲に係る発明について、明細書に十分に裏付けられているとはいえないし、当該技術分野の専門家が実施することができる程度に明確かつ十分に開示されているとはいえない。

なお、請求の範囲が明確に記載されておらず、また、明細書に十分な裏付けがされておらず、明細書に明確かつ十分に開示されていない発明については、国際調査を行っていない。